

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/FR05/000093

International filing date: 14 January 2005 (14.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: FR
Number: 0400366
Filing date: 15 January 2004 (15.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 30 March 2005 (30.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 20 JAN. 2005

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

1er dépôt

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*01

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 260899

REMISE DES PIÈCES DATE 15 JAN 2004 LIEU 75 INPI PARIS 26Bis SP N° D'ENREGISTREMENT 0400366 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 15 JAN. 2004		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE GROSSET-FOURNIER & DEMACHY 54, rue Saint-Lazare F-75009 Paris	
Vos références pour ce dossier (facultatif) IFB 03 DH INR ORUS			
Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie			
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° / /	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° / /	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° / /	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° Pays ou organisation Date / / N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR		<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
Nom ou dénomination sociale		INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Adresse		Rue 147, rue de l'Université	
		Code postal et ville	
Pays		F-75338 PARIS CEDEX 07	
Nationalité		FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		FRANCAISE	
N° de télécopie (facultatif)			
Adresse électronique (facultatif)			



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 15 JAN 2004 LIEU 75 INPI PARIS 26Bis SP N° D'ENREGISTREMENT 0400366 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	
--	--

DB 540 W / 190600

Vos références pour ce dossier : (facultatif)	IFB 03 DH INR ORUS	
6 MANDATAIRE Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)	DEMACHY Charles GROSSET-FOURNIER & DEMACHY 54, rue Saint-Lazare 75009 PARIS 01.42.81.09.58 01.42.81.08.71	
7 INVENTEUR (S)		
Les inventeurs sont les demandeurs	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE	Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance	Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES	Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE Charles DEMACHY Mandataire GROSSET-FOURNIER		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE
DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE *P.*
CINNABARINUS

5

La présente invention concerne l'utilisation de souches monocaryotiques de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, pour la mise en oeuvre d'un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine dans la

10

A l'heure actuelle, deux modèles fongiques sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels dans le cadre de la production d'enzymes intervenant dans les biotransformations végétales, telles que les métalloenzymes. Il s'agit d'*Aspergillus*, et de *Trichoderma*, qui appartiennent au groupe des deutéromycètes. Toutefois, les rendements de production à l'aide de ces modèles, notamment en production de laccases, n'excèdent pas les 150 mg/l.

15

La présente invention découle de la mise en évidence par les Inventeurs du fait que la transformation de souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* déficientes pour l'activité laccase à l'aide de vecteurs contenant le gène codant pour cette laccase et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur identique au promoteur *pLac* endogène de la laccase de *P. cinnabarinus*, conduit à une production équivalente de laccase que lors de la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction de laccase par induction du promoteur endogène de cette laccase par action de l'éthanol sur des souches monocaryotiques de *P. cinnabarinus* non déficientes pour l'activité laccase, et qui égale

20

25

Des résultats similaires ont été obtenus par les Inventeurs en utilisant le promoteur *gpd*, et le promoteur *sc3* de *Schizophyllum commune*, en lieu et place du promoteur *pLac* susmentionné.

La présente invention a pour objet un procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et notamment

30

une souche de champignon filamentaire de la souche *Pycnoporus cinnabarinus* ou d'une souche de champignon filamentaire de la souche *Pycnoporus cinnabarinus* transformée par le gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

5 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée, est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie (fusion des

15 noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

20 Avantageusement, la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée dans le procédé susmentionné de l'invention, est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Les protéines recombinantes déterminées surexprimées dans le cadre de la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, correspondent soit à des protéines endogènes de *Pycnoporus*, soit à des protéines exogènes différentes des protéines endogènes de *Pycnoporus*. Notamment ces protéines exogènes correspondent à des protéines

25 endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé tel que décrit ci-dessus, caractérisé en ce que les protéines les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

30 - les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.

Avantageusement, dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, la souche

monocaryotique de *Pycnopus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, afin de ne pas avoir à séparer la protéine recombinante déterminée de la protéine endogène à laquelle elle correspond lors de la purification de ladite protéine recombinante.

5 En variante, toujours dans le cas de la préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnopus*, la souche monocaryotique de *Pycnopus* utilisée peut ne pas être déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée, ladite souche étant alors transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène
10 codant pour la protéine recombinante déterminée marquée afin de la distinguer de la protéine endogène lors de l'étape de purification. A titre d'illustration, la protéine recombinante déterminée peut être marquée par une étiquette histidine (His-tag).

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnopus*,
15 caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnopus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnopus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnopus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle
20 d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la
25 syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnopus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., Herpoel I., Frasse P., Moulkha S., Lesage-Meessen L., Asther M.
30 1999 : Laccase production by a monocaryotic strain *Pycnopus chinabartinus* derived from a dikaryotic strain : World Journal of Microbiology and Biotechnology 15, 681-684.

LE MINISTRE DE L'ÉCONOMIE, DES FINANCES ET DE L'ÉNERGIE
LE MINISTRE DE L'AGRICULTURE, DE LA PÊCHE ET DE LA FAUNE
LE MINISTRE DE LA SANTÉ, DES SERVICES SOCIAUX ET DE LA FAMILLE

Pycnoporus cinnabarinus représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

5 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

10 - une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

15 L'invention a plus particulièrement pour objet un procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

20 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

25 * le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glycéraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

30 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention concerne plus particulièrement un procédé tel que défini ci-dessus, de préparation de la laccase correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, notamment par une étiquette His-tag, dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture, notamment selon la méthode décrite dans Sigoillot J.C., et al. (1999) susmentionné.

L'invention a également pour objet la séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

L'invention concerne également tout vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* susmentionné, ou une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* susmentionné, ou d'une séquence dérivée telle que définie ci-dessus.

L'invention concerne plus particulièrement tout vecteur d'expression tel que défini ci-dessus, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
- ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.

L'invention concerne également toute cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression tel que défini ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute cellule hôte susmentionnée, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

5 L'invention a également pour objet l'utilisation de vecteurs d'expression tels que définis ci-dessus, ou de cellules hôtes susmentionnées, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée telle que définie ci-dessus.

10 L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée qui suit du SEPC : Système d'Expression *Pycnoporus cinnabarinus*, à savoir du développement d'un modèle d'expression fongique performant permettant de s'affranchir des modèles industriels utilisés actuellement par les grands groupes européens (*Aspergillus* et *Trichoderma*).

15 En résumé, il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus spécifiquement de champignon filamenteux du groupe basidiomycète, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui a été développé par les Inventeurs pour la surexpression de protéines d'intérêt industriel. Ce travail a été fait dans le cadre de l'étude de métalloenzymes, telles que les laccases, et en particulier a permis de cloner les gènes impliqués pour leur surexpression, et de surproduction des laccases en grande quantité à l'aide de fermenteurs, ceci afin de les
20 utiliser dans des applications industrielles à usage alimentaire (panification, préparation de boissons afin de moduler la couleur du thé, aider à la clarification des jus de fruits et des boissons alcoolisées, formation d'agropolymères) et non alimentaire (traitement des « jeans », dégradation de polluants aromatiques dans les sols, bioblanchiment des fibres lignocellulosiques dans le domaine des pâtes à papier).

25 **I) Obtention de lignées monocaryotiques de *Pycnoporus cinnabarinus* pour la transformation du champignon et la surproduction de gènes d'intérêt.**

30 Cette étape a pour but d'isoler puis de sélectionner des lignées cellulaires haploïdes issues des spores sexuées d'un champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, qui seront utilisées en temps qu'hôte pour l'expression des gènes d'intérêt. *P. cinnabarinus* est un champignon hétérothallique qui se trouve à l'état sauvage sous forme dicaryotique (deux noyaux non appariés par cellule) à partir duquel des lignées monocaryotiques sont sélectionnées (un noyau par cellule), potentiellement plus stable et donc utilisable pour la transformation génétique. Dans le cadre de cette

étude les Inventeurs se sont attachés à sélectionner de lignées monocaryotiques déficientes pour l'activité laccase (lac). A l'état dicaryotique, le champignon peut se multiplier par voie végétative (Fig. 1). Mais, sous l'influence de conditions environnementales particulières, on peut induire, en laboratoire, la formation d'organes de fructification. Au sein d'hyphes différenciées appelées basides, a alors lieu la caryogamie (fusion des noyaux), suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes. Après germination, chaque basidiospore engendre un mycélium monocaryotique. Un simple test colorimétrique permet ensuite de ne sélectionner que les souches dépourvues d'activité laccase.

1) Isolement des souches monocaryotiques

Le milieu de fructification est composé d'extrait de malt 2% (P/V) et de l'agar (1,6% P/V). Les cultures sont ensemencées dans des boîtes de Pétri et gardées à 30°C dans le noir pendant 15 jours avant de les exposer au jour 2 à 3 semaines à température ambiante. Le corps de fructification apparaît orange-rouge. Les monospores sont alors récoltées avec de l'eau stérile sur le couvercle de la boîte de Pétri. La suspension est diluée et mise en culture dans des boîtes de Pétri contenant un milieu MA2 (malt 2% P/V et agar 2% P/V) dans le but d'isoler des colonies. Des cultures pures isolées sont piquées et gardées dans du milieu MA2 à 30°C pendant 5 jours et stockées à 4°C.

Dans ces conditions, une souche monocaryotique déficiente pour l'activité laccase a été sélectionnée pour la transformation avec le vecteur d'expression dans le but de surexprimer le gène de la laccase. Une étude en Southern blot a été effectuée et a permis de démontrer que cette souche est déficiente pour le gène codant pour la laccase chez *P. cinnabarinus*.

2) Test rapide de détection de l'activité laccase des colonies monospores

Un morceau de mycélium est déposé dans une boîte de Petri et recouvert d'une goutte de syringaldazine 0,1% (P/V) en solution éthanolique ; Après 15 minutes, un changement de couleur est observé. Le 2,2-azino-bis-[3-éthylthiazoline-6-sulfonate] (ABTS) peut être utilisé également comme substrat pour révéler une activité laccase.

3) Conditions de cultures pour produire la laccase

Un inoculum est prélevé des précultures qui ont poussé 10 jours à 30°C dans des fioles de Roux contenant 200 mL d'un milieu synthétique avec la composition suivante pour 1L : maltose (20 g), tartrate de diammonium (1,84 g), tartrate de disodium (2,3 g),
5 KH_2PO_4 (1,33 g), CaCl_2 , H_2O (0,1 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,07 g),
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,046 g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,035 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g), extrait de levure
(1 g), solution de vitamines (1 mL/L) selon Tatum et al. (Biochemical mutant strains of
Neurospora produced by physical and chemical treatment. American Journal of Botany,
37 : 38-46, 1950). Le mycélium de deux fioles est collecté, mélangé à 100 mL d'eau
10 stérile et broyés au mixeur Ultraturax 60 sec. Pour produire de la laccase, le milieu
synthétique est inoculé par 1 mL de la suspension de mycélium. Le milieu (100 mL) est
ensuite incubé à 30°C dans des fioles erlenmeyer bafflées de 250 mL sous agitation
(120 rpm).°

15 II) Clonage du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur en vue de la construction d'un vecteur d'expression

Il s'agit d'un système d'expression eucaryote et plus particulièrement de
champignon filamenteux, *Pycnoporus cinnabarinus*, du groupe basidiomycète pour la
20 surproduction de protéines recombinantes déterminées. Le modèle d'étude sélectionné
est celui de la laccase de *P. cinnabarinus*. A l'heure actuelle, deux modèles fongiques
sont utilisés préférentiellement par les grands groupes industriels. Il s'agit d'*Aspergillus*
et de *Trichoderma* qui appartiennent au groupe des Deutéromycètes. Ce système
d'expression est donc tout à fait original et devrait combler la lacune concernant le
25 développement de système d'expression basidiomycète compatible avec les exigences
des industriels (possibilité de production à grande échelle de protéines sécrétées dans le
milieu extra-cellulaire et culture du champignon producteur en fermenteur).

30 1) Clonage de gène de la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* et de son promoteur

Dans une première étape, les Inventeurs ont amplifié un fragment du gène codant
pour la laccase à l'aide d'amorces nucléotidiques dégénérées (Fig. 2). Les amorces
dégénérées amont F2 (SEQ ID NO : 6 ; CAYTGGCAYGGRTTCTTCC) et aval R8
(SEQ ID NO : 7 ; GAGRTGGAAGTCRATGTGRC) ont été déduites, respectivement ,

des régions de liaison au cuivre I et IV des laccases d'organismes voisins et utilisées dans une réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) en utilisant l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* I-937. A 10 µl de mélange réactionnel sont ajoutés : 100 ng d'ADN génomique; 0.2 mM de dATP, dCTP, dTTP, and dGTP; 25 pmol de chaque amorce nucléotidique; 0.1 volume de tampon 10X *Pfu* polymerase (100 mM Tris-HCl, 15mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3) and 1 U de polymerase *Pfu*. Le mélange est chauffé à 94°C pendant 5 min avant d'ajouter la polymérase. Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 4 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 3 min. Une étape de 10 min à 72°C est effectuée afin de finir la réaction. Une bande de 1,64 kpb a été obtenue correspondant à la partie centrale du gène de la laccase. La séquence ADN a été clonée dans pGEM-T afin de séquencer cette partie du gène.

Par une technique de Southern blot (Fig. 3), nous avons défini les sites de restriction appropriés afin d'obtenir un fragment d'ADN minimum, pouvant contenir l'intégralité de gène de la laccase, et qui sont susceptibles de servir à amplifier les extrémités 5' et 3' manquantes. Un Southern blot a été effectué avec l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* avec les enzymes, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sma*I and *Xba* I et a permis de sélectionner *Pst*I qui donne une bande de 3.5 kpb par digestion de l'ADN génomique. Afin d'amplifier les parties manquantes du gène, une technique de PCR inverse a été utilisée avec un mélange de PCR contenant des amorces nucléotidiques spécifiques de la partie centrale précédemment isolée et de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus*. La réaction de PCR est effectuée avec 150 ng d'ADN coupé par *Pst*I et recircularisé sur lui-même par ligation et les amorces nucléotidiques Fex (SEQ ID NO : 8 ; GGATAACTACTGGATCCGCG) et Rex (SEQ ID NO : 9 ; CGCAGTATTGCGTGGAGAG). Les conditions de la réaction sont les suivantes : 5 cycles de 94 °C, 5 min; 55 °C, 30 s; et 72 °C, 5 min; puis 25 cycles of 94 °C, 30 s; 55 °C, 30 s, et 72 °C, 4 min avec une étape finale de 10 min à 72 °C. Le fragment d'ADN amplifié correspond à une bande de 2,7 kpb qui a été cloné dans pGEM-T et séquencé.

L'intégralité du gène codant pour la laccase a été ensuite définie en combinant la partie centrale et les parties 5' et 3' amplifiées. Afin de vérifier cette séquence, l'fragment du gène a été amplifié (Fig. 4) avec les amorces nucléotidiques

P. cinnabarinus. Ce gène a été également cloné à partir de l'ADN génomique de *P. cinnabarinus* ss3 et s'est avéré être identique à celui isolé chez *P. cinnabarinus* I-937.

5 2) *Construction du vecteur d'expression utilisant le promoteur du gène de la laccase*

10 A partir de la séquence du gène de la laccase, les Inventeurs ont cloné le promoteur de ce gène en utilisant la même stratégie employée précédemment pour l'isolement du gène, c'est-à-dire avec une technique de PCR inverse sur un fragment d'ADN génomique (3,5 kpb) coupé cette fois-ci par l'enzyme de restriction *Bgl*III (Fig. 5). Deux mille cinq cent vingt sept kpb en avant du gène de la laccase ont été ainsi cloné par PCR inverse et séquencé. Ce promoteur a été placé dans un vecteur une résistance à l'ampicilline pour son sous-clonage dans la bactérie et une résistance à la phléomycine utilisé comme marqueur de sélection dans le champignon. Un terminateur du gène
15 codant pour l'hydrophobine sc3 de *Schizophyllum commune* a été placé en aval afin de terminer l'étape de transcription. Ce vecteur appelé pELP sera utilisé pour l'expression homologue de la laccase (Fig. 6). Deux autres promoteurs hétérologues ont été utilisés dans cette étude. Ce sont les promoteurs des gènes codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (*gpd*) et l'hydrophobine (*sc3*) de *Schizophyllum commune* (Fig. 6), constituant respectivement les vecteurs d'expression pEGT et pESC.
20 L'intégralité des séquences nucléotidiques de vecteurs pEGT (SEQ ID NO : 12), pESC (SEQ ID NO : 13), et pELP (SEQ ID NO : 14), se trouvent dans les figures 7, 8 et 9 avec les positions du promoteur, du marqueur de sélection et du terminateur.

25 **III) Transformation de la souche monocaryotique avec les vecteurs d'expression (modèle d'étude : la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*)**

 1) *Préparation du mycélium pour l'obtention de protoplastes*

30 Un quart d'une colonie cultivée en milieu solide (10 jours) est homogénéisé avec un mixeur (type Ultraturax, vitesse lente) pendant une minute dans 50 ml de milieu YM (par litre : glucose 10 g, peptone 5 g, extrait de levure 3 g, extrait de malt 3 g). Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 250 ml stérile où l'on rajoute 50 ml de milieu YM, puis incubé à 30°C et sous agitation (225 rpm) pendant 20 heures. La culture est une nouvelle fois homogénéisée pendant 1 min (vitesse lente) et on rajoute 100 ml de

milieu YM. Le broyat est transféré dans un erlenmeyer de 500 ml et mis en culture pendant une nuit à 30°C.

2) Préparation des protoplastes

La culture de champignon est centrifugée pendant 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant (tube de 50 ml). Seize g (poids humide) sont lavés dans 40 ml d'une solution de MgSO_4 0,5 M ou de saccharose 0,5 M. Dans le cas de l'utilisation du saccharose, l'enzyme lytique utilisée pour digérer les parois est diluée dans le saccharose. Le mycélium est ensuite centrifugé 10 min à 2000 rpm et le surnageant éliminé. Concernant la lyse des parois fongiques, on ajoute au mycélium provenant de 50 ml de culture, 10 ml d'enzyme lytique (Glucanex, Sigma) dilué à 1 mg/ml dans une solution de MgSO_4 0,5 M. La digestion se fait dans un erlenmeyer de 500 ml à 30°C sous faible agitation pendant 3 à 4 heures. Pendant cette incubation, l'apparition des protoplastes est contrôlée au microscope. Dix ml d'eau stérile sont rajoutés, puis mélangés délicatement. Les protoplastes sont laissés 10 min, le temps que l'équilibre avec l'eau se fasse (les protoplastes vont flotter à la surface). Ils sont ensuite centrifugés 10 min à 2000 rpm dans un rotor oscillant. Le surnageant contenant les protoplastes est transféré délicatement dans un nouveau de 50 ml. Le culot restant peut-être re-incubé avec 25 ml d'une solution de MgSO_4 0,5M pour récupérer le maximum de protoplastes (on répète alors l'étape de centrifugation). Un volume de sorbitol 1 M, égal à celui de la préparation des protoplastes, lui est rajouté. Pendant 10 min, on laisse les protoplastes relarguer l'eau. Cette préparation est ensuite centrifugée 10 min à 2000 rpm. Le surnageant est éliminé, tout en laissant un peu de sorbitol. Les protoplastes sont transférés dans un nouveau tube. Le précédent tube est rincé avec la solution de sorbitol 1M et les protoplastes récupérés, ajoutés dans le nouveau tube. Les protoplastes sont comptés et centrifugés 10 min à 2000 rpm. Ils sont ensuite dilués à une concentration de $2 \cdot 10^7$ protoplastes par ml dans la solution de sorbitol 1M. Une solution de CaCl_2 à 0,5 M (1/10) est rajoutée aux protoplastes.

3) Transformation des protoplastes

Pour la transformation, 100 µl de protoplastes sont transformés avec 5 à 10 µg de matériel génétique. Le matériel génétique est transformé dans les protoplastes par électroporation. Les protoplastes sont transformés dans les protoplastes par électroporation. Les protoplastes sont transformés dans les protoplastes par électroporation.

Deux et demi ml de milieu de régénération (pour 100 ml : glucose 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12,5 g, KH_2PO_4 0,046 g, K_2HPO_4 0,1 g, bacto peptone 0,2 g, extrait de levure 0,2 g) sont rajoutés aux protoplastes qui sont incubés une nuit à 30°C. Des boîtes de sélection (milieu YM contenant de la phléomycine à 7 $\mu\text{g/ml}$, boîtes carrées) sont préchauffées à 37°C. Sept et demi ml d'un mélange de top agar (Low Melting Point agarose 1% dilué dans un milieu YM contenant de la phléomycine 7 à 10 $\mu\text{g/ml}$) sont ajoutés au milieu de régénération contenant les protoplastes et sont versés sur les boîtes de sélection préchauffées. Quand la solution de top agar s'est solidifiée, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 4 jours. Les transformants sont alors transférés sur de nouvelles boîtes de sélection.

4) Ciblage des transformants

A partir de 16 g de mycélium, on obtient généralement de l'ordre de 1 à $2 \cdot 10^7$ protoplastes. Le pourcentage de régénération est de 10 %. Concernant le vecteur pESC, les monokaryons ont été transformés avec le vecteur contenant le cDNA (BRFM 472, 473 et 474) ou le gène codant pour la laccase de *P. cinnabarinus* (BRFM 470 et 471) (Fig. 10). En parallèle, d'autres monokaryons ont été transformés avec les promoteurs pEGT (GPD11, 12 et 13) ou avec le vecteur pELP (12.3, 12.7 et 12.8) contenant le gène codant pour la laccase (Fig. 10). Au vu des résultats deux transformants se dégagent du lot avec des activités équivalentes, les transformants 12.7 et GPD14. L'activité au cours du temps a été suivie pour les transformants GPD14 et 12.7 (Fig. 11). L'activité est détectable à partir de 3-4 jours et augmentent jusqu'à 12 jours pour atteindre approximativement 1200 nkatal/ml soit 72000 U/l avec ajout d'éthanol dans le milieu de culture.

Légende des figures

Figure 1 : Isolement de souche monokaryotique déficiente pour l'activité laccase.

Figure 2 : Isolement du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* laccase.

Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 4 : Séquence du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice pLac du gène codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à l'ATG codant pour la méthionine de la laccase).

Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression pEGT, pESC, pELP, utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*.

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5112), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

Figure 8 : Séquence nucléotidique du vecteur pESC, contenant le promoteur du gène *sc3* (1-1033), un marqueur de résistance à la phléomycine (1540-2855) et le terminateur du gène *sc3* (1104-1540).

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol.

Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants GPD 14 et 12.7 en fonction du temps avec ou (témoin) sans éthanol.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une protéine recombinante déterminée, ledit procédé étant effectué par surexpression du gène codant pour cette protéine déterminée dans une souche monocaryotique de champignons filamenteux de l'espèce *Pycnoporus* du groupe basidiomycète, et comprend :

10 - une étape de mise en culture de la souche monocaryotique de *Pycnoporus* susmentionnée, ladite souche étant transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée, dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant à un promoteur endogène des champignons susmentionnés, ou d'un promoteur différent (encore désigné promoteur exogène), ledit promoteur étant constitutif ou inductible,

15 - le cas échéant une étape d'induction du promoteur susmentionné, lorsque celui-ci est inductible,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la protéine recombinante déterminée, produite dans le milieu de culture.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée pour la surexpression du gène codant pour la protéine recombinante déterminée est telle qu'obtenue par mise en culture de la souche dicaryotique d'origine à 30°C dans le noir pendant 15 jours, suivie d'une étape d'exposition au jour 2 à 3 semaines à température ambiante jusqu'à la formation d'organes de fructification correspondant à des hyphes différenciées appelées basides, au sein desquels a alors lieu la caryogamie, suivie de la méiose qui conduit à la formation de quatre spores sexuées, ou basidiospores haploïdes génétiquement différentes, qui, après germination, engendre un mycélium monocaryotique.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est une souche de *Pycnoporus cinnabarinus*.

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
 - ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou l' α -amylase.
- 10

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

15

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

20

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur endogène de cette laccase,
- 30

- une étape d'induction du promoteur susmentionné, notamment par addition d'éthanol, ou de sous-produits agricoles contenant de la lignocellulose comme la paille de blé, les sons de maïs et la pulpe de betterave, ou des composés à cycle aromatique

correspondant à des protéines endogènes de basidiomycètes autres que *Pycnoporus*, telles que les enzymes basidiomycètes intervenant dans les biotransformations végétales.

5 5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les protéines recombinantes déterminées correspondent aux protéines endogènes de *Pycnoporus* suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,
 - ou la cellobiose déshydrogénase, la xylanase, la β -glycosidase, l'invertase, ou
- 10 l' α -amylase.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est déficiente

15 pour le gène codant pour la protéine endogène à laquelle correspond la protéine recombinante déterminée.

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, de préparation de protéines recombinantes déterminées correspondant aux protéines endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce que la souche monocaryotique de *Pycnoporus* utilisée est transformée

20 à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour la protéine recombinante déterminée marquée, notamment par un marqueur histidine.

8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

25

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase
- 30 de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur correspondant au promoteur du gène de cette laccase.

• Les laccases sont des enzymes oxydantes qui catalysent la dégradation de nombreux substrats organiques et inorganiques. Elles sont produites par de nombreux champignons, en particulier par les basidiomycètes. Les laccases sont des enzymes à cuivre, ce qui leur confère une activité oxydante. Elles sont utilisées dans de nombreux domaines, notamment dans le traitement des eaux polluées, dans la production de colorants naturels, dans la synthèse de polymères, etc.

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnopus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnopus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnopus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnopus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,
- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,
- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

8. Procédé de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnopus* selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnopus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnopus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnopus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4,

* ou le promoteur *sc3* de l'expression du gène codant pour l'hydrophobine de *Schizophyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 5,

comme la 2,5-xylidine, l'acide vératrylique, le guaïcol, l'alcool vératrylique, la syringaldazine, l'acide férulique, l'acide caféique et les lignosulfonates,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* correspondant au promoteur endogène de la laccase susmentionnée, la séquence dudit promoteur *pLac* étant représentée par SEQ ID NO : 3,

- une étape d'induction par l'éthanol du promoteur *pLac* susmentionné,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant le gène codant pour une laccase de *Pycnoporus*, le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur exogène choisi parmi :

* le promoteur *gpd* de l'expression du gène codant pour la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase de *Schizothyllum commune*, dont la séquence nucléotidique est représentée par SEQ ID NO : 4.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, de préparation de laccases recombinantes correspondant aux laccases endogènes de *Pycnoporus*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5 9. Procédé selon la revendication 8, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

15 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20 10. Séquence nucléotidique codant pour le promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25 11. Vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* selon la revendication 10.

12. Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac* selon la revendication 11.

30 13. Vecteur d'expression selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métalloenzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus* susmentionnée produite dans le milieu de culture.

5 11. Procédé selon la revendication 10, de préparation de la laccase recombinante correspondant à la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus* représentée par SEQ ID NO : 2, caractérisé en ce qu'il comprend :

10 - une étape de mise en culture d'une souche monocaryotique de *Pycnoporus cinnabarinus*, le cas échéant déficiente pour le gène codant pour la laccase endogène de *Pycnoporus*, transformée à l'aide d'un vecteur d'expression contenant la séquence nucléotidique SEQ ID NO : 1 codant pour la laccase recombinante représentée par SEQ ID NO : 2 le cas échéant marquée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur exogène *gpd* ou *sc3*,

15 - la récupération, et, le cas échéant, la purification de la laccase recombinante, le cas échéant marquée, représentée par SEQ ID NO : 2 produite dans le milieu de culture.

20 12. Vecteur d'expression, tel que le plasmide *pELP*, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID NO : 3 du promoteur *pLac* de la laccase endogène de *Pycnoporus cinnabarinus*, et correspondant à la séquence SEQ ID NO : 3, ou toute séquence dérivée de ce promoteur par substitution, addition ou suppression d'un ou plusieurs nucléotides et conservant la propriété d'être un promoteur de l'expression de séquences.

25 13. Vecteur d'expression selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il comprend un gène codant pour une protéine recombinante déterminée, et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur *pLac*.

30 14. Vecteur d'expression selon la revendication 12 ou 13, caractérisé en ce que la protéine recombinante déterminée est une protéine correspondant à une protéine endogène de *Pycnoporus* choisie parmi les suivantes :

- les métallo-enzymes, telles que la laccase, ou la tyrosinase,

- les cellulases, les chitinases, les protéinases, les lipases, les amylases,

les nucléases.

15. Cellule hôte transformée à l'aide d'un vecteur d'expression selon l'une des revendications 12 à 14.

5 16. Cellule hôte selon la revendication 15, correspondant à des cellules monocaryotiques de souches de *Pycnoporus*, telles que les souches de *Pycnoporus cinnabarinus*.

10 17. Utilisation de vecteurs d'expression selon l'une des revendications 12 à 14, ou de cellules hôtes selon la revendication 15 ou 16, pour la mise en oeuvre d'un procédé de surproduction d'une protéine recombinante déterminée selon l'une des revendications 1 à 9.

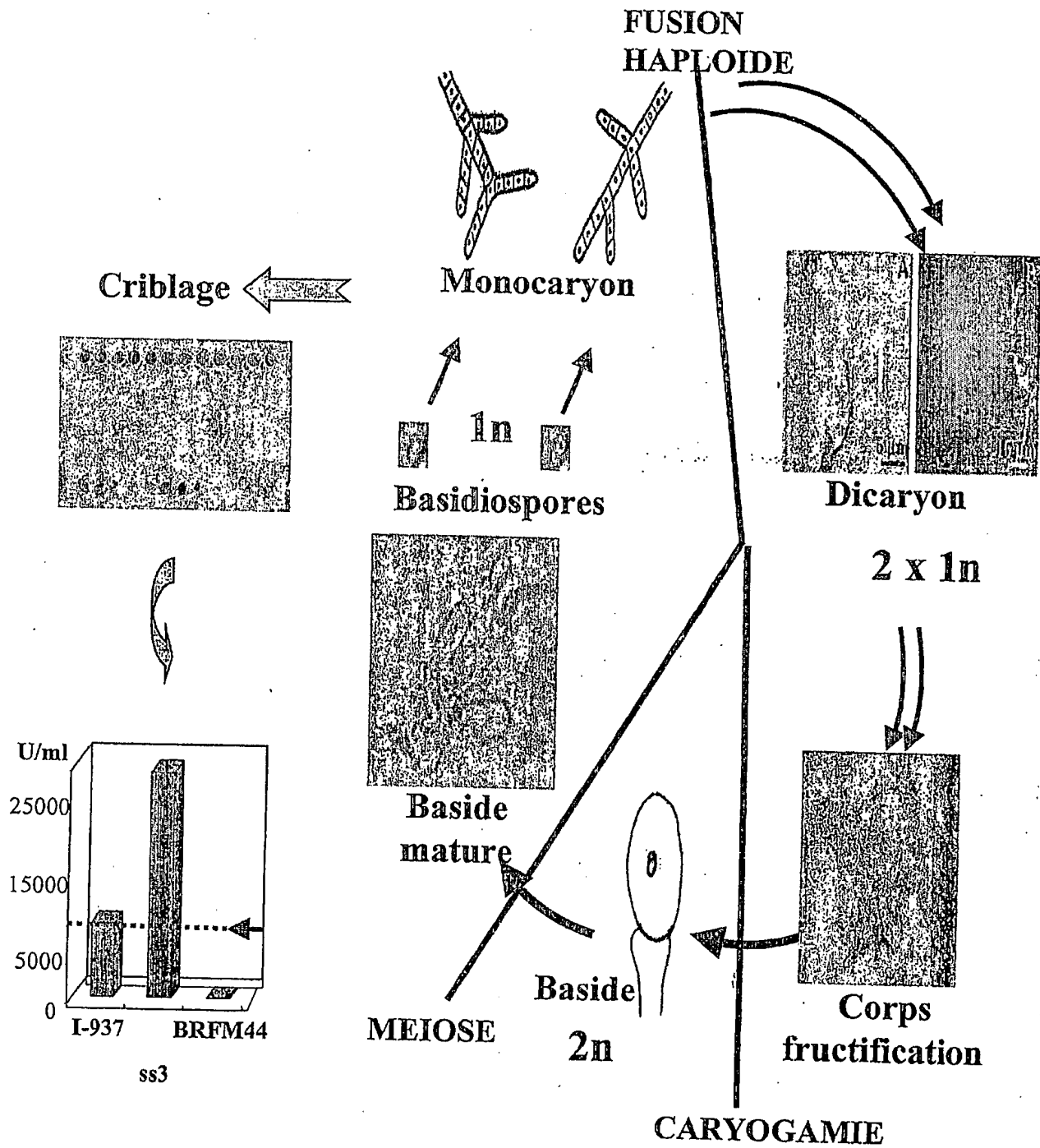


Figure 1 : Isolement de souche monokaryotique déficiente pour l'activité laccase

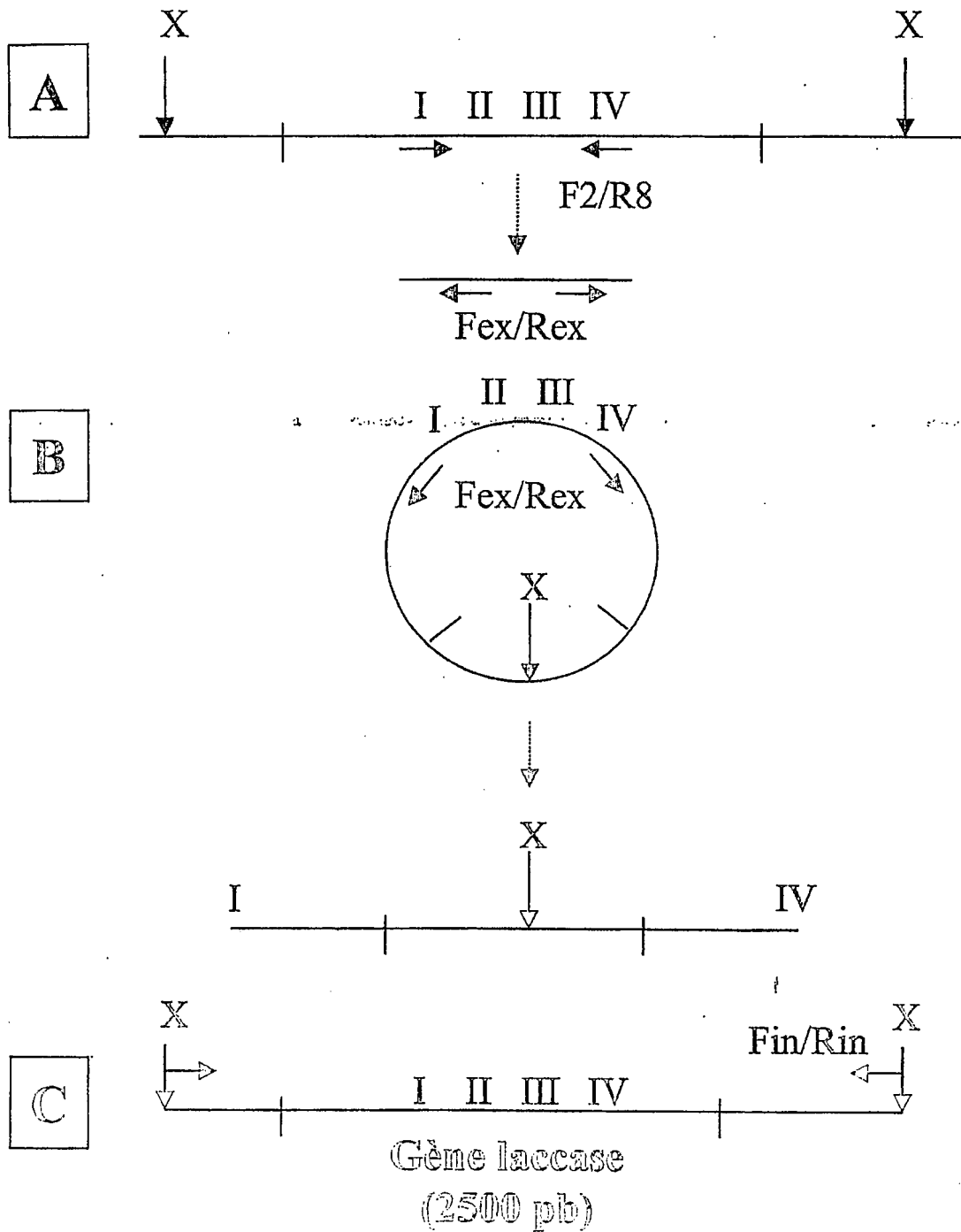


Figure 1 : Clonage du gène codant pour la laccase de *F. sporobolus*.

3/12

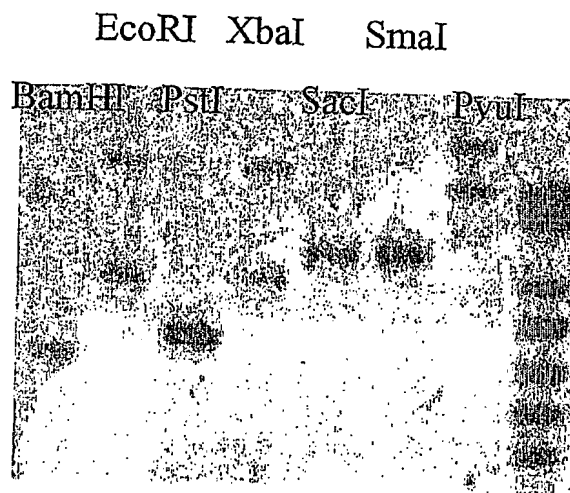


Figure 3 : Etude en Southern blot du gène codant pour la laccase de *Pynoporus cinnabarinus*

4/12

CTGCAGACATCTGGAGCGCTGTCTTTCCCTAGTATTAATGATGTCTGTCGCGAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAGTTTATAGTAGGAC 100

CTGTCCACCAAAACCTCTTTCTGATCATGTGAGGTTCCAGTCCCTCTTCTTCTGCTCTCGTCTCCCTCACCCTGTGGCCAACGCGAGCCATAGGGC 200

NSRFQSLFFFLVLSLTAVANANAIGP 25

CTGTGCGGACCTGACCCTTACCAATGCGGCTCAGCCCGATGGCTTCGCTCGCGAGGCGCTGTTGTAACGGTATCACCCCTGCCCTCTCATCAC 300

VADLTLTNAQVSPDGFAREAVVVNGITPAPLIT 58

AGGCAATAGgtatgtatatgtctgtccctcagagctacatcatgtatcccaatcgtttagGGCGATCGATCCAGTCAATGTATCGACCAG 400

G N K G D R F Q L N V I D Q 72

F2

TTGACAAATCATACCATGTTGAAACATCTAGTATTgtaagggttcagttttcccgactaccatgttattgaccatcaccactcgtag CATTGGGACGG 500

L T N H T M L K T S S I H W H G 88

(I)

CTTCTTCAGCAAGGACGAACTGGGCGGATGGTCCGCGTTCGTGAACAGGATGTCCATCGTTCGGGCACTCGTTCTTGATGACTTCAAGTTCCC 600

F E Q Q G T N W A D G P A F V N Q C P I A S G H S F L Y D F Q V P 121

(II)

GACCAAGCAGgtacgaattccgtacacgttttcattgctgcgaactaaacctctcttactagGGACTTTCTGGTACCATAGCCATCTCTCCACGCAATA 700

D Q A G T F W Y H S H L S T Q Y 137

(II)

CTGCGATGGTTTGGGGGGCTTCTGCTGCTACGACCCCAACGATCCTCACGCTAGCCTGTATGACATTGATAACGgtgagcagatcatggtatcgcaa 800

C D G L R G P F V V Y D P N D P H A S L Y D I D N D 163

tattgctccacttatgtctcctggcatccagACGACACTGTCAATTACGCTGGCTGATTGGTATCACGTTGCTGCCAAGCTCGGACCTCGCTTCCCgtac 900

D T V I T L A D W Y H V A A K L G P R F P 184

gtgtcaaatgtctcagagagatctcactatatacagactagactcacttcgtgattacagATTGGCTCCGATTCAACCTTATCAATGACTTGGTCGAA 1000

F G S D S T L I N G L G R T 198

CCACTGGCATAGCACCGTCCGACTTGGCAGTTATCAAGGTACGCGAGGCGAAGCGtaagtattggtggtcatcactgcacattggctctgatacatggc 1100

T G I A P S D L A V I K V T Q G K R 216

ctgtttccacagCTACCGCTTCCGCTTGGTGTGCTTTCTTGGCATCCGAACATACATTACGACTTGTATAATCACACAATGACTATAATTAGGCGGGA 1200

Y R F R L V S L S C D P N H T F S I D N H T M T I I E A D 245

CTCGATCAACACTCAACCCCTAGAGGTGATTCAATCCAGATTTTTCGCGCGAGCGTACTCTTCTGTTGgttaggtcgtagggtcctgtcatcaagtgtg 1300

S I N T Q P L E V D S I Q I F A A Q R Y S F V 268

cagacattctctatcaccccttttcaatgagcagCTGGATGTAGCCAGCGGTGGTAACTACTGGATCCGCGCAACCCCTGCTTCCGAAACACAGGTT 1400

L D A S Q P V D N Y W I R A N P A P G N T G F 291

TTGCTGGTGAATCAATTCTGCCATCTGCGTTATGATGGCGCACCCGAGATCGAGCCTACGTTCTCCAGACTACTCCTACGAAGCCTCTGACGAGGT 1500

A G G I N S A I L R Y D G A P E I E P T S V Q T T P T K P L N E V 324

CGACTTGCATCCTCTCTCGCCTATGCTGTGgtacgtgtctcaagaacctcgatcactaagtgcattgcaactcatatggtgcatgacagCCTGGCAGC 1600

D L H P L S P M P V P G S 337

CCCGAGCCCGAGGTGTGACAAAGCTCTGAACCTTGGTCTTCAACTCTgtgagtagtggcgcgctccgtagcacacgttcgaacaagcctgataccat 1700

P E P G G V D K P L N L V F N F 353

gcagAACGGCACCACTTCTTCATCAACGACACACCTTTGTCGCGCGCTGTGCTCCAGCTTCTGCTACAAATCCTCAGTGGGGCGCAGGCGGCTCAGGAC 1800

N G T N F F I N D H T F V P P S V L L Q I L S G A Q A A Q 385

CTGGTCCCGGAGGCGAGCGTGTGTTCTTCCAGCACTCGTCCATTGAGATATCCTTCCCTGCCACTGCCATGCCCCCTGGATTCCCCCATCCGTTCC 1900

L V P E G S V F V L P S N S S I E I S E F P A T A N A P G F P H E F F H 419

(III)

ACTTGCACGGTgtacgtgtgccttccctcgtctaaagcgaggagtcgatatctgactcccatcacagCACGCTTCGCTGTGCTCCGGAGCGCC GGGAGC 2000

L H G H A F A V V R S A G S 433

(III)

AGCGTCTACAACTACGACAAACCGATCTTCCGCGAGCTCGTCAGCACCGCGAGCCCGCGGACA ACCTCAGGATTCGCTTCGAGACCAATAACCCAGGCC 2100

S V Y N Y D N P I F R D V V S T G Q P G D N V T I R F E T N N P G P 467

R8

CGTGGTTCCTCCACTGCCACATTCACCTCCACCTCGACGAGGCTTTGCTGTAGTCATGGCGGAGGACACTCCGGACCAAGGCCCGGAAC CCTGTTCC 2200

W E L H C H I D A G F A V V M A E D T P D T K A A N P V P 500

(IV) (IV) (IV) (IV)

TCAGGCGTGGTCCGACTTGTGCCCATCTATGATGCACTTGACCCAGCGACCTCTGAGCGGGATTTGTTACTGTGACCTGGT GTGGGGGAACATGTGCA 2300

Q A W S D L C P I Y D A L D P S D L 518

GGGCTTTCATCGATCAGGACTTTCAGGTTGGCATAATATACCTCACGGCTGGATGACTCGGACAGCGTGTGGCGTGGGTGTAACCTCTGCTTGTATGT 2400

TGAAAAAGGATTTTATGTAGAACATTTATGAGCAATCAGCAATCAATAGGATTGTGCGGTTTCGACGAAATGCTTGTCTCCCTGACATTACTTTTG 2500

TGCGAGAAATGGGTCCATGATACATCATTTAGGCTCTCAATACCAAGAGGATTACCCATGTCAATACCAAGATCATGTCTTCTGCTGTCGCAATGG 2600

TCTCATGTTGCGTTGAGCAGATCGCAGTACGTTGAAAGCGGATTAGTAT TACATGCAATCACAACATTGGAAGGGGGCATGCAGAGGTTACGTCGCG 2700

TCAGTCGGCCAAGTAGCGACCTTTGCCGCACTGCCTGTAACTGAACGTATGCTTCAGAACTCCGTCCGTATCGAGAGCGATCGTGTACGTTCCGGGAT 2800

AGATCCATTGATCCCGCTCTGGTCCGCGCGTGCATGGCCCCGAGCGTCACCGGACGCTTCGCGATCCGCGTTTCTTAGGGGCGAGGCGGTGTACCCG 2900

CGTGTACGAGACGAGCTGCTTGTTCGGGTGGGSCGAAGGCCGGAAGGAGCCACTCACGAAGACAAATGCGACGTAACTCCGAGGTAGCCTTGCCCGTGTTA 3000

GTACACGCGACGAGAACGTGTGAGCGGCGCGAGGTGAGGAGGCGCGCTTCTTGACCGCGCTGTACGAGGTGCGAAATCGAATACGTGATGGCG 3100

GTCTCCAAAGTCCGTGACGTTGCTGCTATCGGCGCGCGCGCTGGAGCTGCCCAAGAGAAATCGAAGGTGGTGAAGTGCAGTCCAAAGCCAAATTCGTA 3200

GACCGCGGTGCCCGTGTACCACTTGTATGTACGCCCCGGGTTTCGAGCGGCTTGGGTCGAGGGTCACTGTCACTCTCGGACCTGATCGCGGTGATGCT 3300

AAATTTGCTGTGTGCTGAGCGCTGCTGAG 3331

AGATCTCCGAACCAGAAATGCGATTGCGTTT CAGGCCCAATTAAGAATAAAGCTGCGTCAGGGCAGCGACGTA
 TCTTGATCCATCATTGACTCACC GG CATCGGCGTCAACACCAAAGCAAGCTCGTCCCACCCATAGGCGTGCA
 CCGGCCGCGTGCGCCATTGAGGTACATGAGCGGGGCGAAAGTCCGCCATTGGTAGCCCTGTCGTGGACGCG
 CGGCGATGAAACGTTTCCCACCATTTGGGAAGAAACGCTGCGGCCCATCATCCCTTACC GGATGACAAGGC
 GCGCTCGCGCCTTTGCCGAGAGGCCGGCGGGCGACATGCACAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGG
 CAATCAGTGGGTGTCCTACGCCGCCACGATGGTGGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCATAAGGCGGCAAGCATC
 ATGATGCTCTCCGATTTCGGGAAGCCTGGTGGATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGCGCAAC
 GTTCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCGAGGAACC
 ATCGGCATCCTCAGCCTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTTCGCGGAAGGTGTCCTAGATGTGAGCGGGC
 TTCTTGGATGATCATGTGCTAACTTTTTCTGACCTCGTGGTGGTACGCATGGCAGGATTGAGCATTACGGT
 ATGCTCCCATTCATAAACGATAACCCCTTCTTCAGGTTGGTTCATCTCCATAGAGCGGCACGCTCTCAAGG
 CCTAGGCTATTACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTAGGGATC
 ACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCCGGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAAGCCT
 TCAGTCACCACATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAGTTGTTTCGTGAGTGGTATACAGTCAT
 TCATGAGGGAATGCCACCGGATAGGGTGTGGCGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGT
 CCTTGTTCATGAATATCATGGGTACATGTGGAGACGGTTAAACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGT
 GTTGGGCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTGGGAGCGGCACAG
 GCAGGCATCGCGCAACAGATCCAGCCATCCGGCCTCTGACATTCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGG
 AGCGAAGAGGTGGGCTCTCTGCAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGATTTCTCTCACCATTGGGAAGAT
 GTGAAAGGCTCCATCATATAGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACACGGCGGGAATACTTATTTATG
 TGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAAGTTGGTAAGTCCCGCAATCTGCGGTTTCAGGCAACAGT
 CTCGGAATAAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAATGCGCACACACGGAGGCTTTA
 GGAGATGAAGCGCCGTGAGCGGTAAGGGAGTTGGTTACCGCGCCCGGCGGACTCTCTCTTTCCAG
 CATCATGTCTCGGCGCAAACCTTTACCCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCCTGTCT
 CTCATGACGTCCGCAATCCAGACCCTTAGCCGGTTCTGTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATTCCTGTCT
 GTCAGCCTGGCCAGTGCCTAGTCCCGTCTCTCTTGTCTGCACTAGAGAAGCCCCATGAGACAGCGTTTGTGC
 TTTATTTCTGCTGTTTCTATAGACACCATAGGGGGCAAACGATCCTGCACGCCAGAGGTATTGGGCTCGTCA
 GATTCCAGTTTTTCTCCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAATCGGCCGGAATGCTATAGCCCTT
 CATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTGAGTCAGGTCGGTTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAA
 CTTCCGCGGACAGCCGCTTTTCAGGGCAAGATAGATCCTCCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAC
 CGAACAATTGACTTACCGACATCCTCCGGGACGCGCAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCC
 GCCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTTCGCGGACGGCCGCTCATCAGGACCAGACAGTCTCAAT
 GTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTGGTGCACCGTTCGCTTAC
 GCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCTGTCTTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTC
 CGCAGGTCCTGAAGACCGCTCGAGTCCCACTTGAAGTTTAGGTAGGACCTGTCCACCAACCCCTCTTTCT
 GATCATG

**Figure 5 : Séquence de la séquence promotrice du gène
 codant pour la laccase de *Pycnoporus cinnabarinus* (jusqu'à
 l'ATG codant pour la méthionine de la laccase)**

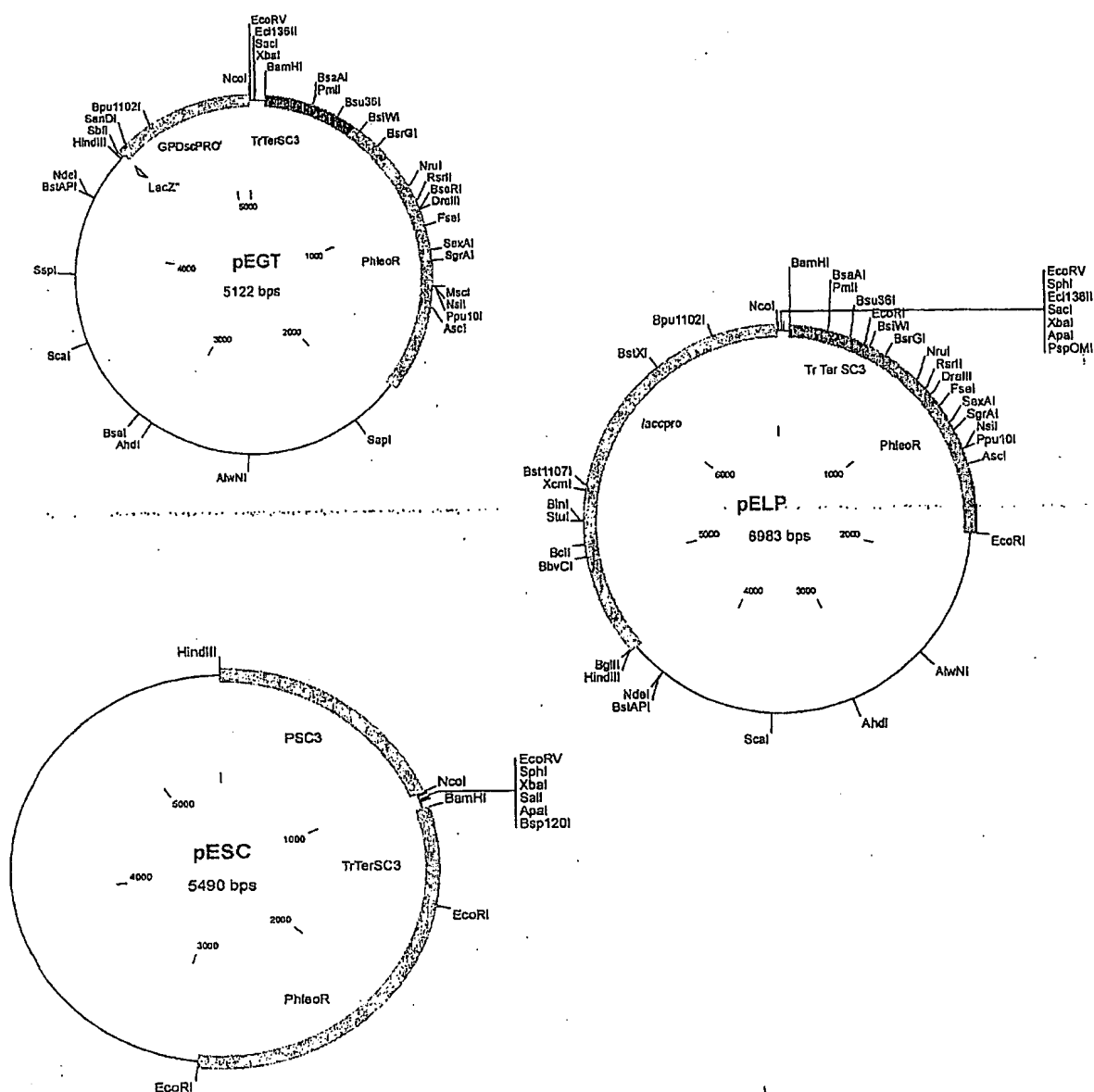


Figure 6 : Carte physique des trois vecteurs d'expression utilisés pour la production de la laccase chez *Pycnoporus cinnabarinus*

CATGGGATATCGCATGCCTGCAGAGCTCTAGAGTCGACGGGCCCGGTACCGCGGCCGCTTAAGACGCGTGGATCCGCAGGTGAAC
 GCGCCTATCGGTGGGATATTTCGGGCGACGGGAGCCTCGGCAATCTGAGCCTCGTTACTGCCTAGCAAAATTCGGAATCCCTTCGATGT
 CATAGGGTCGCGGACAAAGTATCGTCTTGCTACATACTCCAAGGTGTGACTCATTCCTCGATAATGAACATTTGTTGTTGTTT
 TTCTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCACACGTGCATGGTTGAATTCGCCACGCAACAACCGCATGACGACATGGCGAACCTAAG
 TAAAGGCTGAGTCGTGGACTAAAGCACTCCACTTTACGGCGAGGATGCCAGTCTACGTCATGAATGAAGCCTCAGGTCCCGAAGTAA
 GGGGTACAAAAGGAGGGTGAAAGGTGACGTTTTCTTACCATTCTCCACCTCCAGACCACCATGCCGGGAATCCAGCTTGCT
 CAAAAAGGTTCTGCCGTACGCCCGCGAAATTCCTTCAGGTGGCCCTATCGCATACATGCACGACTTCAAAACATCCATTCTATC
 ATTTTGGGATCGTACAATTATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCCTTTCTTTTACTCTCCGGCCAGTCTATGTAGAGGTAAA
 GTACAAGCGTCAAAGGATCAGGCATCTAGAGCGCGCCGCTTGCTTCGCCGCTTAGAGCGCGCGTCTGCTTCGCCGCTAGACG
 AGCAGGTCCGACACACGGCGGGAGTAGCCCACTCTGTGCTACAGGCAATGAGCTTACGAAGCTCTTGCTGATCGCGATGCCG
 GGGATCGATCCACGCGCTTAAGGGCGCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGGGCGCGCTCGGACCGCGGTGTTGCTCGCGCTAGC
 TCAGTCTGCTCCTCGGCCACGAAGTGCACGCAAGTTCGGCGCGGGTTCGGCAGGGCGAACTCCCGCCCCACGGCTGCTCGCCGAT
 CTCGGTCATGGCCGGCCGGAGGCGTCCCGGAAGTTCGTGGACACGACCTCCGACCACTCGGCGTACAGCTCGTCCAGGCCGCGCAC
 CCACACCCAGCGCGGTGTTGTCCGGCACCACTGTCCTGGACCGCGCTGATGAACAGGGTCACGTCGTCGCCGACCAACCGGC
 GAAGTCGTCCTCCACGAAGTCCCGGGAGAACCCGAGCGGTCGGTCCAGAACTCGACCGCTCCGGCAGCTGCTGCTCGCGTGA
 CCGGAACCGCACTGTTCAACTTGGCCATGCAATGGTGATGGGCATTATGTGTGATGGGATGCGATGGGAGAGGGGAAGTCTGCTGATG
 GGAGTGTGGAGAAAGAGGGAGACGGCGGGCGCGCGCTTTATACCCACGCCGAAAGATCCGATCGATACGACAAAACGGGA
 TGAACACATCGGCGCGCGCTGGACTGCGCCATCTGCAATGCCAGCCAGTCCCGTCCGGCGCCACCACAGCCCTGGTGCAGT
 CCCCCTCGAGGGCGACGCTCTATTCTATCCATGCGCGCAATTCAGGTGCGCGGTTCGCAAGAACAGTCTTCGCAAGTCTTCGCA
 TGGGCTGCGACCCCTGTCTACCTCTCATCTAACCCCTCCGGCGCTTCGCAAGTACAGTACTAATCTCACACCGAAGAGGCTCTCGCG
 CACCCTCGATCCCGAGCAGTTCCTTACATGCCACAGCGTCAGAATTGAACACAATGCACGTCARATCAGTCCCGGGAATTCGT
 AATCATGTTGATAGCTGTTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAG
 CCTGGGTGCGCTAATGAGTGAGCTAACTACATTAATTGCGTTCGCGTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGAAACCTGCTGCTCGCGCT
 GCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGGCGTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCGCTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCG
 GTCGTTGCGCTCGCGGAGCGGTATCAGTCACTCAAAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACCGAGGAAAGAA
 CATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCCGCGTTCGCTGCGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
 AGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAAGCTCC
 CTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTC
 ACGCTGTAGGTA TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGCTTCAGCCGACCGCTGCGCC
 TTATCCGGTAACATCTGCTTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGCTTACGCACTGGCAGCAGCCACTGTAACAGGATTAGCAGA
 GCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGTTGTTCTCGCT
 CTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCCGCTGTTAGCGGTGGTTTTTTGTTT
 GCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAA
 AACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTCACTAGATCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAA
 TCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTT
 ATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTCTGCAATGATACCGCG
 AGACCCAGCTCACCAGGCTCAGAGTTTATACGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCACTTTATC
 CGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTAAAGTTTGGCGCAACGTTGTTGCCATTGCT
 ACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCACTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCA
 TGTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGCTCCGATCGTTGTGAGAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGC
 AGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGATCGTATTTCTGTGACTGGTGAAGTACTCAACCAAGTCACTCTGAGAATAG
 TGTATCGCGGACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTATCAATT
 GGAACCGTTCTTCCGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCCACTGA
 TCTTCAGCATCTTTTACTTTACACGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAAGGAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGAC
 ACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGACGGATACATATTG
 AATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGCTCTAAGAAACCATATTATCA
 TGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGCTCTCGCGGTTTCGGTGTGACGTTGAAACCTCTGACACATGC
 AGTCCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGCAAGCCCGTCAAGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGG
 TGTGCGGGCTGGCTTAATATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTA
 AGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCCATTCCGCAATCAGGCTGCGCACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTA
 CGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTCCAGTACAGAGCTGTGTAACACGAC
 GGCCAGTGCCAAAGCTTGCATGCTGACGAGTGCAGGCGAGCGCGCCACCCAGCTATCCCGCGCGGTCCGGACCCAAAAATA
 GCGGGCCCCGCGCGCCCGTCCGGCGAGCGGGTGTATCTACGAACGGAAGTGGGAGGCGACTCGGAAGAGTTTGGTTAGAAAGGG
 GAACACCATCGCGGACGGCCAGTGTCTGDDCAGCTGAGCGTGCAATTGTGTTCAATTCTGACCTGTGGCATGTAAGGAACGTGCTC
 GGGATCGGAGGGTGGCGGAGAGCCTCTTCGTTGAGATTAGTAAGTGTACTGCGAAGCCGCGGAGGGGTTAGGATGAGAGGTAG
 ACAGGTCGCGAGCCAGGTGCGAGAAAGGACTGCGAAGGACTGTTCTTCGACCGCGCACCTGCAATTGCGCGCATGGATAGAATAGA
 GCGTCCCGCTCGAGGGGAGTCCAGAGGGCTGGTGGTGGCGCCGACGGGACTGGCTGGGCATTGTCAGATGGCGCGAGTCCAG
 GCCCGCGGATGTGTTATCCCGTTTGTGAGTATCGATCGGATCTTTCGGCGGTGGGTATAAAGCGCGCGCGCGCGCTCTCCCT
 CTTTCTCCAGCACTCCATCCAGAGCACTCCCTCTCCATCGCATCCCATCACACAATAATGCCCATCAC

Figure 7 : Séquence nucléotidique du vecteur pEGT, contenant le promoteur du gène *gpd* (4480-5122), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène *sc3* (71-507).

8/12

AGCTTCTCCGGCCCCGAATCGAACGGCAGGATGTGTGGGCGTGTCCAAATATTGCCATGAAAATCTGTGAGAAGTGAGCCCTCTCGTCAC
 CCTGTACAGCTTCGCTGAGTTGAAAAGCAGGGTTCATCTTGGGCTCACTGATGCACTGAGCTCGACCGGAGAACTAAATGACCAAGCCGG
 AGTGTTCACTAACTTAACGCCGGGTATTACGGGCAGCTTCTCTATGTTGCGCTACGACGTAGATCACCAGCCCATGAACGGGGGAAACG
 GGGAGGGGTGCGTTTGGTACGCTCTTACGCTCTGCTATGTTGTTATGACAGCGCTCTGCAAGATGGGCACGAGATGCGCCGAGCCG
 GCCAGTGTGCTCGGATGTCCACTGTTGAGGCCATCCTTTGTAGACAGACGGAAGAGCTTTGGAGGTGCGATTCTCTACGAATGGGA
 AGGGGCTTAGATGGAGAGTGACACGCTCTGAGCTCCCAACACGCTTCGCGGAGGGTGCCTCTCCGCGGACATTCACCTCAGTTCATTG
 TTCTGACCTGCTAAATTGTATAGACCGGCCAACACCTTGTGTACGCGCCATCATAACAGTGCCTCGACAGAGCTTCCCACTCAGTCCG
 CGCTCCCTCAATCAATCCCACTAACTCGCCGCTCTGCCCCCTCGCGCTCGACACGTCGCTTGGAAAGACCCGGGACCGGCGTCCG
 TCCCCCTTCCCTCCGCGTCTGTCATGCACGCGAGCTTAATGTTGCTGCAGGCGAGCCGTAAGTATATTCAAAGGCGTAGCGAATGAATAG
 CAGGCGCGCGGGGACCTGGCACGCGCGGCATGAACATGCGAGACTTGGGTGACGATAACTTGAACACGCGCGGAATGAATATCCA
 AACGCGCGGGGAGAAAATAATTTACGGGAGCCTCCCCAGGTATAAAAGCCCTCACCCGCTCACTCTTTCTCCAGTGAACACCCCACT
 TCAACTACCCAGCCCTTCTTCTCTGCTATCCTTCTTACGAGCTTCAAGCGTCCAAAGGATCGGATGCGCATGCTGCGAGCTTACCGCTAGAGTGCAC
 GGGCCCGGTACCGCGCGCGCTTAAGACGCGTGGATCCGCAAGTGAACGCGCTATCGGTGGGATATTGGGCGACGGGAGCCCTCGG
 AATCTGAGCCTCGTACTGCTAGCAAATTCGGAATCCCTTCGATGTATAGGGTGCAGCAAGTATGCTGCTGTACATACTCCAAG
 GTGTTGACTCAATCCCTCGATAATGAACATTTGTTGTTGTTGTTGTTCTATCCGCTCAGTCACGCGACCCCAACGTCATGTTGAAC
 TTGCTCCCGGCAACACCGATGACGACATGCGAACTGCGAACTAAAGCACTCCACTTTACCGCGAGGATGC
 CAGTCTACGTCATGAATGAAGCCTCAGGTCCCGAAGTAAGGGGTACAAAAGGAGGGTGAAAGGTGGACGTTTCTTACCACTCTTCA
 CCTCCAGACCACTGCGCGGAATTCACAGCTTGTCTCAAAAAGGTTCTGCGCGTACGCGCGGAAATTCCTTCGAGGTGCCCCCTATCG
 CATACATGACGACTTCAAAACATCCATTCTATCATTTTGGGATCGTACAATATTAGACATGTTGTACAACGTTACATTCTTCTCTT
 TTACTCTCCGCGCCCTCTATOTAGAGGTAAAGTACAAGCTTCAAGGATCGGCAAGTTCGTTGGAACAGCACTTAGAGCGCGCTTAG
 AGCGCGCGCTCTGCTTCCGCGGTAGACGAGCAGGTGCGACACGCGCGGAGTAGCCCACTCGTTGCTGCTACCAAGGCAATGAGCTT
 CACGAAGCTCTTGTGATCGCGATGCGCGGATCGATCCACGCGCTTAAAGCGCGCGCGGTACCCCTCGGACCCGTCGGCGCGCTC
 GGACCGGCGGTGTTGTTGCGGCTGCTGCTGCTCTGCTCGGCGCAAGTGCACGCGAGTTGCCGCGCGGTGCGCGCAGGGCGAATC
 CCGCCCCACGGCTGCTGCGGATCTCGGTCTGCGCGCGCGCGGCGGCGGAAAGTTCGTTGGAACAGCACTTCCAGCCTCGCGCT
 ACAGCTCGTCCAGGCGCGCACCCACACCGAGGCAAGGTGTTGTCGCGCACCACTGCTGCTGGAACCGCGCTGATGAACAGGGTACG
 TCGTCCCGGACACACCGCGGAAGTCTGCTCCACGAAGTCCCGGAGAAACCGAGCCGCTCGGTCCAGAACTCGACCCCTCCGCGCAG
 GTCCGCGCGGTGCGACCGGAACCGGCACTGCTCACTTGGCCATGATGATGATGGGATTTATACCCACGCGCGGAAAGTCCGATCGGAT
 GGAAGTGTCTGGATGGGAGTCTGGAGAAAGAGGGAGACGCGCGCGCGCGCTTTTATACCCACGCGCGGAAAGTCCGATCGGAT
 CTGACAAAACGGGATGAACACATCGCGCGCGCGCTGGAAGTGCAGCGCACTGCAAAATGCCAGCCAGTCCCGTCCGCGCGCACCA
 GCGCTGGTGGAGTCCCTCGAGGGCGAGCTCTATCTATCCATGCGCGCAATTCGAGGTGCGCGGTGGAAGAACAGTCTTCCGAGT
 CCTTCTCGACCTGGGCTGCGGACCTGTCTACCTCTCATCTCAACCTTCCCGGCTTCGCGAGTACAGTTACTAATCTCACACCGAAGAG
 GCTCTCGCGCACCTCCGATCCCGAGCAGTTCCTTACATGCCACAGCGTCAAGATGAACACAATGCACTGATCAATCCGCGG
 GAAATTCGTAATCATGGTCTAGCTGTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATTCACACAAATACGAGCCGGAAGCATAAAGTG
 TAAAGCCTGGGTGCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTCGCTTCCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCTGCTGCGCA
 GTGCACTTAATGAATCGGGCAACGCGCGGGGAGAGCGGCTTTCGCTATTTGGGCTCTTCCGCTTCCGCTCACTGCTGCTGCGCTC
 GGTGCTTCCGCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAGGCGGTAAACGGTTATCCACAGAACTCAGGGGATACGAGGAAAGAAC
 ATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAGGCCGCGGTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGC
 ATCACAATAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGCGGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTG
 CGCTCTCTCCGACCTGCGGCTTACCGGATACCTGTCTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCATAGCTCAGCTGTA
 GGTATCTCAGTTCGCTGAGGCTGCTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGACGAACCCCCCGTTACGCGCGACCGCTGCGCTTATCCGCTA
 ACTATCGCTTGAAGTCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGGCACTGGCAGCAGCACTGGTAACAGGATAGCAGAGCGAGGTATGTA
 GCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCGAGT
 ACCTTCGGAAGAAAGAGTTGCTTGTATCGGCAACAAACCCGCTGAGTGGGTAGCGGTGTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATACG
 CGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTACGCGGTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAAACTCACGTTAAGGGATT
 GGTGATGAGATTATCAAAAGGATCTTCACTAGATCCTTTAAATTAAGAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAAC
 TTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACTCTCAGCGATCTGCTATTTTCGTTTATCCATAGTTGCTGACTCCCGCTG
 GTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCGATGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCAGCGCTCCAGTT
 ATCAGCAATAAACAGCGCAGCGGGAAGGGCGAGCGAGAAGTGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCC
 GGAAGCTAGAGTAAGTATGCTCCGAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTTGCTACAGGATCGTGGTGTACGCTCGCTGTTG
 GTATGGCTCAITTCAGCTCCGCTTCCCAAGATCAAGCGGATTAATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
 CTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGCGAGCACTGCATAATTTCTTACTGTATGCCATCCGT
 AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAATCAACCAAGTCAATCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTGTCTTTCGCCGCGTCAAT
 ACGGGATAATACCGCGCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTATCTTGGAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTAC
 CGTGTGTGAGATCCAGTTGATGTAACCCACTCGTGCAACCCAACTGATCTTCAAGCATCTTTACTTTCAACAGCGTTTCTGGGTGAGCAA
 AAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATIGA
 AGCATTATACAGGGTTATTTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTCCC
 CGAAAAAGTGCCACCTGACGCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGCTCGC
 GCGTTTCCGTTGATGACGGTGAAAAACCTCTGACACATGCAAGCTCCCGAGACGGTCAAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGAC
 AAGCGCGTCAAGGCGCGTACGCGGTGTTGGCGGTGTGCGGGCTGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCAC
 CATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCATTCGCCATTCAAGGCTGCGCAACTGTTGGGA
 AGGCGATCGGTGCGCGCTCTGCTATACCGCAGCTGCGGAAAGGGGATGTGCTGCAAGCGGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGT
 TTTCCAGTCAAGAGCTTGTAAACCGACCGGCGGCA

Figure 2 : Séquence nucléotidique du vecteur pESV, contenant le promoteur du gène rat 5'-100% de l'expression de l'insuline.

Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP, contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le terminateur du gène sc3 (71-507) (suite de la séquence, page suivante)

10/12

CAGCGAAGGTCCGTTGCGGATGGGAAGCAGGCAATCAGTGGGTGTCTACGCCGCCACGATGGTTCGGGGAGCGTAGGCGCCCTCCCA
 TAAGGCGGCAAGCATCATGATGCTCTCCGATTTCGGGAAGCCTGGTGGGATGCTGGAGAGACTCTCTCCGAGAGACCAGTGTGCGCAAC
 GTTCCTGGCCTGGAAGACTTTAAAGTGAGTGTAGAAGGGCGAGCAGAGGACGATCATCGGATTGCGAGGAACCATCGGCATCCTCAGC
 CTGGGAAGGATGGCTCTTGGTAGACATTCCGGGAAGGTGTCTAGATGTGAGCGGGCTTCTTGGATGATCATGTCTGTAACCTTTTCTGA
 CCTCGTCGGTGGTACGCATGGCAGGATTAGCATTACGGTATGCTCCCAATCATAAACGATAACCCCTTCCTTCAGGTTGGTCATCTC
 CATAGAGCGGCACGCTCTCAAGGCCTAGGCTATTCACACCTCCTTCGCAACATCCCTATTACGGTGTCTGTAAGGAACGACTTGTCTAT
 GGGATCACATGAAGTGCAGCATACTGTTCCGCCGTCTCGCAGTACAGACGCTAGTACGGGAAGTCGACATCCAAAGCGTTCAGTACCA
 CATGGCAAAAAAGCTGCACCATACTCTTTATGGTGAAGTGTTCGTGAGTGGTATACAGTCATTTCATGAGGGAATGCCACCGGATAGG
 GTGTGGCGGCCGCAATATTCATCGCCTGGCAATAGTCGATGTGCGTCTCTTGAATGAATATCATGGGTCACATGTGGAGACGGTTAA
 ACAGCGTTGACTGTGAATCCCTGGTGTGTGTTGGGCCGAACAGGTACGTTGCAGGAACACCAATATCTCTTCGGCAGCCAGTTCTTTG
 CGAGCGGCACAGGCAGGCATCGCGCAACAGATCCAGCCATCCGGCTCTGACATTCCGGGATACCTGAAGCCCTTCAGGTACGGAGC
 GAAGAGGTGGGCTCTCTGAGCGATTGGCGGACGGATAGCTGTATTTCTCTCTCACCATTGGGAAGATGTGAAAGGCTCCATCATAT
 AGCGGCTCAACTCTACCTCGAATGTCCAAACAGCGCGGAATACTTATTTATGTGGACAAGGCCGAGCTATGATAGCTTGCTCCCGAA
 GTTGGTAAGTCCGCAATCTGCGGTTACGGCAACAGTCTCGGAAAAAATAAGAAGAATATTGTAGGTGCGTGTAGGCGTATCGCCCAAA
 TGCGCACACAGGAGGCTTTAGGAGATGAAGCGCCGTGAGCGGTAAAGGAGTTGGTTACCGCCGCCCGACCGACTCTCTCTCTTT
 CCCAGCATCATGTCTCGCGCAAACTTTACCTCTATTGACCAACTCCACGAGAAAGCAGGAACAGCTTCTCTCTCTCATGACGTCC
 GCAATCCAGACCCCTAGCCGTTGTTACTCATCGTTATCCCTGCCGCCATCGTAGTGGAGTCAGCCTGGCCAGTGGTGTAGTCCCGTCT
 CTCTTGCTGCACTAGAGAAGCCCATGAGACAGCGTCTTTTGTCTTATTTCTGTGTTTCTATAGACACCATAGGGGCAAAACGATCCTG
 CACGCCCAGAGGTATTGGGCTCGTCAGATTCCAGTCTTTCTCTCGGTCTGAATCGGCTGCACGGCAGATAAAATCGGCCGGAATGCT
 ATAGCCCTTCATAGCCCGCTATGAGAGTCGCAAAAGGCTTGTCAAGTCAGGTGCGTTCGAGTGGCTCTCACGAAGAGCGTCAACTTCGG
 CGACAGCCGCTTTTCAAGGCAAGATAGATCCTCCATCATCCCTACTGCGCTCAGCGCCGGTAACGAAACAATTGACTTACCGACATC
 CTCGGGACGCGCAAAATGCTGTTTCGACGGAACGTAATCCTCTTCGTCCCGCTCTTTTCGCTCTCACGCATTCCGTGTGGTTCGCGCA
 CGGCCGCTCATCAGGACAGACAGTCTCAATGTCTGGTACCGGCACAATGGTGACACTGCGGCAACTGAGTAGGTCTGGTCACTCTG
 GTGCACCGTCGCTTACGCTGACCTTCGGGATACTGTCTGCAGACATCTGGAGCGCTGTCTTCCCTAGTATAAATGATGTCTGTCC
 GCAGGTCCTTGAAGACCGCTCGAGTCCACTTGAGTTTAGGTAGGACCTGTTCTCCACAACCCCTCTTTC

**Figure 9 : Séquence nucléotidique du vecteur pELP (suite),
 contenant le promoteur du gène laccase (4457-6983), un
 marqueur de résistance à la phléomycine (507-1822) et le
 terminateur du gène sc3 (71-507)**

11/12

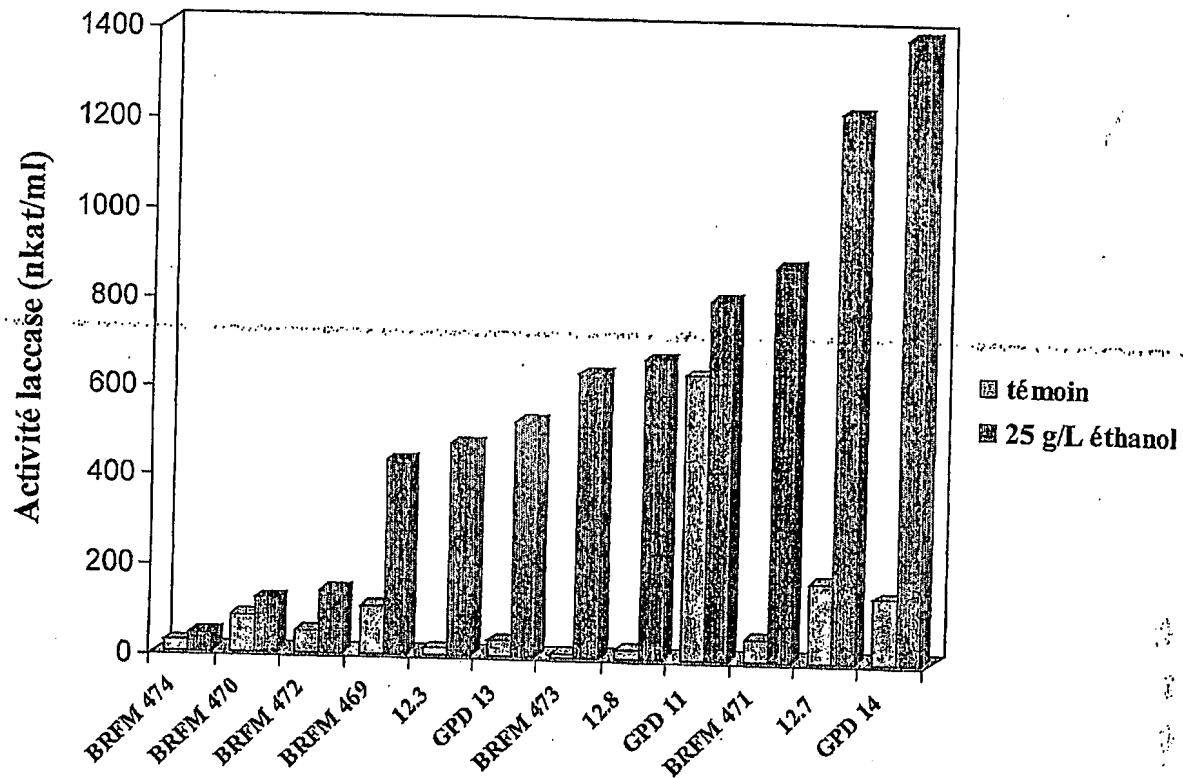


Figure 10 : Résultats de production des transformants présentant les activités les plus importantes. La culture a été effectuée avec ou sans (témoin) éthanol

12/12

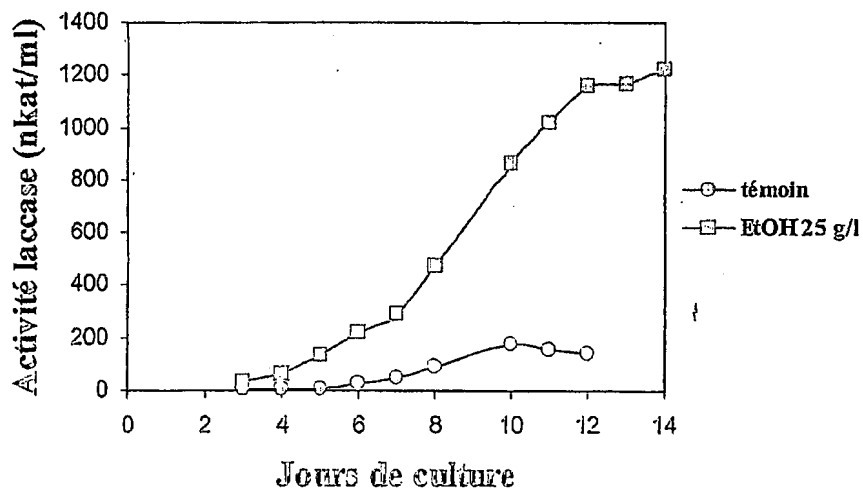
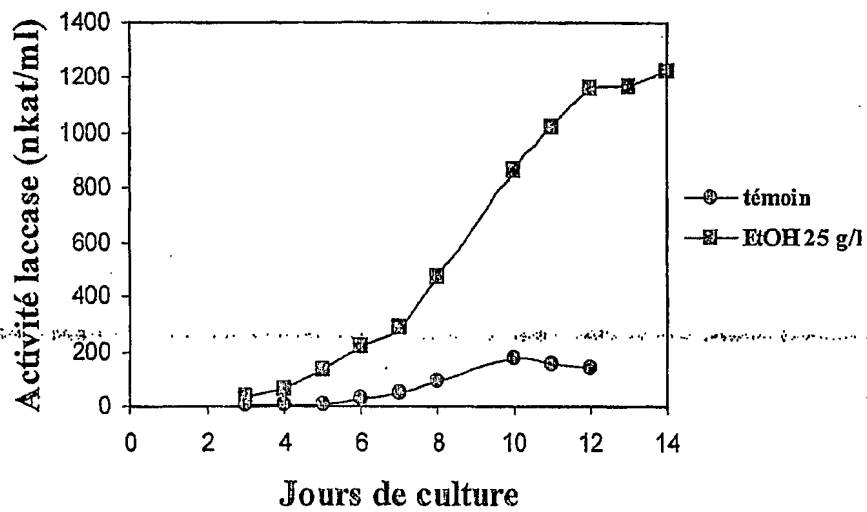


Figure 11 : Suivi des activités laccase des transformants CTE 14 et 117 en fonction du temps avec un réactif para-Subanole

ctccttcgtg gtaggtcgta ggctcctgtc atcaagtttg cagacattct tagatacacc 1320

tttttcaatg cagctggatg ctagccagcc ggtggataac tactggatcc gcgcaaacc 1380

tgccttcgga aacacaggtt ttgctgggtg aatcaattct gccatcctgc gttatgatgg 1440

cgcacccgag atcgagccta cgtctgtcca gactactcct acgaagcctc tgaacgaggt 1500

cgaattgcat cctctctcgc ctatgcctgt ggtacgtgtc tcaaagaacc tcgatcacta 1560

agtgcattgc aactcatatg gtgcatgaca gcctggcagc cccgagcccg gaggtgtcga 1620

caagcctctg aacttgggtc tcaacttcgt gactactggc gcgcttccgt agcacacgtt 1680

cgaacaaagc ctgataccat gcagaacggc accaacttct tcatcaacga ccacaccttt 1740

gtcccgccgt ctgtcccagt cttgctacaa atcctcagtg gggcgagggc ggctcaggac 1800

ctgggtcccg agggcagcgt gttcgttctt cccagcaact cgtccattga gatatacttc 1860

cctgccactg ccaatgcccc tggattcccc catccgttcc acttgacagg tgtacgtctg 1920

ccttccccctc gtctaaaggc ggagtcgata tctgactccc atcacagcac gccttcgctg 1980

tcgtccggag cgcggggagc agcgtctaca actacgacaa cccgatcttc cgcgacgtcg 2040

tcagcaccgg ccagcccggc gacaacgtca cgattcgctt cgagaccaat aaccagggc 2100

cgtggttccct ccactgccac attgacttcc acctcgagc aggcctttgct gtagtcatgg 2160

ccgaggacac tccggacacc aaggccgga accctgttcc tcaggcgtgg tcggacttgt 2220

gccccatcta tgatgcactt gacccagcg acctctgagc gggattgtta ctgtgacctg 2280

gtgtgggggg aacatgtcga gggctttcat cgatcagggc ctttcaaggc tggcataata 2340

tacctcacgg cctggatgac tcggacagcg tgtgggcgtg ggtgtaactc tgcttgatgt 2400

tgaaaaaagg attttatgta gaacaattta tgagcaatca gcaatcaata ggattgtgtc 2460

ggtttcgagc aaatgtcttg tctccctgac attacttttg gtgcgagaaa tgggtccatg 2520

atacacatca ttgagctctc aataccaaga aggattaccc atgtcaatac ccaagatcat 2580

gtcttcgctg tccgcaatgg tctcatgttg cgttgagcag atcgagtagc gttgaaaagc 2640

gattagtatt acatgcaaca tgcaacattt ggaagggggc atgcagaggt tcagctcgcg 2700

tcagtcggcc aagtagcgac ctttgccgca ctgcctgtta acctgaacgt atgcttcaga 2760

actcgcgcg tatcgagagc gatcgtgtac gttccgggat agatccattg atccccgctc 2820

tggtcggcgc gtgcgatggc cccgagcgtc accggcagct tcgcgatcgc gcttttcccta 2880

ggggcgaggg cgtgtacccg cgtgtacgag acgagctgct tgttcgggtg gggcgaaggc 2940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 3960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4020

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4080

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4140

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4200

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4260

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4320

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4380

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4440

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4500

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4560

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4620

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4680

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4740

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4800

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4860

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4920

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 4980

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5040

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5100

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5160

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5220

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5280

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5340

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5400

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5460

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5520

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5580

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5640

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5700

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5760

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5820

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5880

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 5940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 6960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7020

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7080

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7140

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7200

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7260

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7320

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7380

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7440

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7500

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7560

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7620

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7680

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7740

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7800

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7860

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7920

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 7980

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8040

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8100

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8160

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8220

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8280

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8340

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8400

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8460

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8520

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8580

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8640

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8700

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8760

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8820

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8880

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 8940

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9000

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9060

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9120

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9180

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9240

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9300

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9360

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9420

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9480

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9540

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9600

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9660

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9720

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9780

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9840

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9900

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 9960

ggggaaggac cactcctcga gacccatgag acgtaacgag tcgagagcctt gggcgaaggc 10020

Ala Lys Leu Gly Pro Arg Phe Pro Phe Gly Ser Asp Ser Thr Leu Ile
180 185 190

Asn Gly Leu Gly Arg Thr Thr Gly Ile Ala Pro Ser Asp Leu Ala Val
195 200 205

Ile Lys Val Thr Gln Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg Leu Val Ser Leu
210 215 220

Ser Cys Asp Pro Asn His Thr Phe Ser Ile Asp Asn His Thr Met Thr
225 230 235 240

Ile Ile Glu Ala Asp Ser Ile Asn Thr Gln Pro Leu Glu Val Asp Ser
245 250 255

Ile Gln Ile Phe Ala Ala Gln Arg Tyr Ser Phe Val Leu Asp Ala Ser
260 265 270

Gln Pro Val Asp Asn Tyr Trp Ile Arg Ala Asn Pro Ala Phe Gly Asn
275 280 285

Thr Gly Phe Ala Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu Arg Tyr Asp Gly
290 295 300

Ala Pro Glu Ile Glu Pro Thr Ser Val Gln Thr Thr Pro Thr Lys Pro
305 310 315 320

Leu Asn Glu Val Asp Leu His Pro Leu Ser Pro Met Pro Val Pro Gly
325 330 335

Ser Pro Glu Pro Gly Gly Val Asp Lys Pro Leu Asn Leu Val Phe Asn
340 345 350

Phe Asn Gly Thr Asn Phe Phe Ile Asn Asp His Thr Phe Val Pro Pro
355 360 365

Ser Val Pro Val Leu Leu Gln Ile Leu Ser Gly Ala Gln Ala Ala Gln
370 375 380

Asp Leu Val Pro Glu Gly Ser Val Phe Val Leu Pro Ser Asn Ser Ser
385 390 395 400

Ile Val Thr Ser Phe Thr Ala Thr Ala Asn Ile Pro Gly Phe Pro His
405 410 415

Pro Phe His Leu His Gly His Ala Phe Ala Val Val Arg Ser Ala Gly
 420 425 430

Ser Ser Val Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Phe Arg Asp Val Val Ser
 435 440 445

Thr Gly Gln Pro Gly Asp Asn Val Thr Ile Arg Phe Glu Thr Asn Asn
 450 455 460

Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile Asp Phe His Leu Asp Ala
 465 470 475 480

Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Thr Pro Asp Thr Lys Ala Ala
 485 490 495

Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu Cys Pro Ile Tyr Asp Ala
 500 505 510

Leu Asp Pro Ser Asp Leu
 515

<210> 3
 <211> 2527
 <212> ADN
 <213> Pycnopus cinnabarinus

<400> 3
 agatctccga accagaaatg cgattgcgtt caggcccaat taagaataaa gctgcgtcag 60
 ggcagcgacg tatcttgatc catcattgac tcaccggcat cggcgtcaac accaaagcaa 120
 gctcgtccca cccataggcg tgcaccggcc ggcgtgcgcc attgaggtac atgagcgggg 180
 cgaaagtccg ccattggtag ccctgtcgtg gacgcgcggc gatgaaacgt ttcccaccat 240
 tgggaagaaa cgtctgcggc ccatcatccc ttcaccggat gacaaggcgg cgtcgcgcct 300
 ttgccgcaga ggccggcggg cgacatgcac agcgaaggtc cgttgcggat gggaagcagg 360
 caatcagtgg gtgtcctacg ccgccacgat ggtcggggag cgtaggcgcc ctcccataag 420
 gcggcaagca tcatgatgct ctccgattcg ggaagcctgg tgcgatgctg gagagactct 480
 ctccgagaga ccagtgtgcg caacgttcct ggcttgaag actttaaggt gagtgtagaa 540
 gggcgagcag aggacgatca tcggattgca ggaaccatcg gcatcctcag cctgggaagg 600
 atggctcttg gtagacattc gcggaagggt tcctagatgt gagcgggctt cttggatgat 660
 catgtcgtaa ctttttctga cctcgtcggg ggtacgcatg gcaggattga gcattacggt 720
 atgcctccca ttcataaacg ataaccctt ccttcagggt ggtcatctcc atagagcggc 780
 acgctctcaa ggcctagggt attcacacct ccttcgcaac atccctattc acggtgtctg 840

taaggaacga cttgtcatgg gatcacatga agtgcagcat actgttcgcc ggtctcgag 900
 tacagacgct agtacgggaa gtcgacatcc aagcgttcag tcaccacatg gcaaaaaagc 960
 tgcaccatac tctttatggg gagttgttcg tgagtgggat acagtcattc atgagggaat 1020
 gccacccgga taggggtgtg cgcccgcaat attcatcgcc tggcaatagt cgatgtgcgt 1080
 ccttgttcaa tgaatatcat gggtcacatg tggagacggg taaacagcgt tgactgtgaa 1140
 tccctgggtgt gtgttgggcc gaacaggtag gttgcaggaa caccaatatc tcttcggcag 1200
 cccagttctt tgcgagcggc acaggcaggc atcgcgcaac agatcccagc catccggcct 1260
 ctgacattcg ggatacctga agcccttcag gtacggagcg aagagggtgg ctctctgcag 1320
 cgattggcgg acggatagct gtatttcctc tctcaccatt gggaagatgt gaaaggctcc 1380
 atcatatagc ggctcaactc tacctcgaat gtccaaacac ggcgggaata cttatttatg 1440
 tggacaaggc cgagctatga tagcttgctc ccgaagtgg taagtccgc aatctgcggg 1500
 tcaggcaaca gtctcggaaa aataagaaga atattgtagg tgctgttagg cgtatcgccc 1560
 aaatgcgcac acacggaggc tttaggagat gaagcgcccg tgagcggtaa gggagttggg 1620
 tcaccgcgc cccgaccgac tctctctctt tccagcatc atgtctcggc gcaaaactta 1680
 ccctctattg accaactcca cgagaaagca ggaacagctt ccttgtctct catgacgtcc 1740
 gcaatccaga cccttagccg gttcggtact catcggtatc cctgccgcca tggtagtgga 1800
 gtcagcctgg ccagtgcgta gtcccgctct tcttgttgca ctagagaagc cccatgagac 1860
 agcggttttt gctttatttc tgctgtttct atagacacca taggggcaaa cgatcctgca 1920
 cgcccagagg tattgggctc gtcagattcc cagttttct cctcggtctg aatcggtgc 1980
 acggcagata aatcgcccg aaatgctata gcccttcata gcccgctatg agagtgcga 2040
 aaggcttgtc agtcaggtag gtcgagtggt tctcaggaag agcgtcaact tcgcgcgaca 2100
 gccgcctttc agggcaagat agatcctccc atcatccct actgcgctca gcgccggtag 2160
 cgaacaattg acttaccgac atcctccggg acgcgcaaat gctgttcgac ggaacgtaat 2220
 cctcttcgtc ccgcctcttt tcgctctcac gcattccgtg tggttcgcgc gacggccgct 2280
 catcaggacc agaccagtct caatgtctgg taccggcaca atggtgacac tgcggcaact 2340
 gagtaggtct ggtcactctg gtgcaccgtc gcttacgctg accttcggga tactgtcctg 2400
 cagacatctg gagcgcctgt ctttccctta gtataaatga tgtctgtcgg caggtccttg 2460
 aagaccctc agtccctct tgaattttag gtcggacctg tccaccaaac cctctttct 2520

gctatgttgt attgaccagc gtctgcagaa gatgggcacg acgatgcgcc gagccggcca 360
 gtgtcgtcgg atgtccactg ttgaggccat ctttttcta gacagacgga agagctttgg 420
 aggtgcgatt cctctacgaa tgggaagggg cttagatgga gagtgcacg tctgagctcc 480
 ccaacacgcc ttccgagagg gtgcgtctcc gcgacattc acctcagttc attgttctga 540
 cctgcctaatt tgtatagacc ggccaacaac cttgctgacg cccatcataa cagtgccctg 600
 cacagagcct tccactcag tcggcgctc cctcaatcaa tccactaac tcgccggctc 660
 tgcccttcg ccgctcgaca cgctcgttg aagagcccg gcacggcgct ccgctcccc 720
 cttccctcgg cgctcgtcag cagcgagcgt taatgttget gcaggcgagc cgtaagtata 780
 ttcaaaggcg tagcgaatga atagcaggcg cgcggggacc tggcacgcgc ggcatgaaca 840
 tgcagacttg ggtgacgata acttgaactc agacgcggcg aatgaatatc caaacgcgcg 900
 ggaagaaaat aatttacggg agcctcccca ggtataaaaag cccctcacco gctcactctt 960
 tctccagtcg aacaccccag ttcaactacc cagcccttcc ttcttcgct atccttcytt 1020
 acaacctgct cgc 1033

<210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 6
 caytggcayg grttcttcc 19

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 7
 gagrtggaag tcratgtgrc 20

<210> 8
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 8
 gagrtggaag tcratgtgrc

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 9
 cgcagtattg cgtggagag

19

<210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 10
 gacatctgga ggcctgtc

19

<210> 11
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Amorce PCR

<400> 11
 atcgaaggtt ccgatgactg acatgac

27

<210> 12
 <211> 5122
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Séquence du vecteur pEGT

<400> 12
 catgggatat cgcattcctg cagagctcta gactcgacgg gcccggtacc gcggccgcct 60
 taagacgcgt ggatccgcag gtgaacgcgc ctatcgggtg gatattcggg cgacgggagc 120
 ctccggcaatc tgagcctcgt tactgcctag caaattcgga atcccttoga tgtcataggg 180
 tcggggacaa gtgactgtct tgctacatac tccaaggtgt tgactcattc cctcgataat 240
 gaacattgtt gttgttgttt gttctctatc cgctcagtcg cgcgacccca cacgtgcatg 300
 gttgaacttc gccacgcaac aaccgcatga cgacatggcg aacctaaagta aaggctgagt 360
 cgtggactaa agcactccac ttacggcga ggatgccagt ctacgtcatg aatgaagcct 420

caggccccga agtaaggggg tacaaaagga gggtgaaagg tggacgtttt cttaccatoc	480
ttccacctcc cagaccacca tgccgggaat tcccagcttg ctcaaaaagg ttctgccogt	540
acgcccgcca aattccttcg aggtggcccc tatcgcatat atgcacgact tcaaaacatc	600
cattctatca ttttgggatc gtacaattat tagacatgtt gtacaacgtt acattccttt	660
cttcttttac tctcggcccc agtctatgta gaggtaaagt acaagcgtcc aaaggatcag	720
gcacttagag cgcgcogtct tgcttcgccc cttagagcgc gccgtcctgc ttccgccogt	780
agacgagcag gtcgcagaca cggcgggagt agccccactc gttgtcgtac caggcaatga	840
gcttcacgaa gctcttgctg atcgcgatgc cggggatoga tccacgcgtc ttaaggcggc	900
cgcggtaccc cctcggaccc gtcgggcccgc gtcggaccgg cgggtgttgt cggcgtcgg	960
cagtctgct cctcggccac gaagtgcacg cagttgcgg cggggtcgg cagggcgaac	1020
tcccgcccc acggtgctc gccgatctcg gtcatggccg gcccgaggc gtcccggaag	1080
ttcgtggaca cgacctcga ccactcggcg tacagctcgt ccaggccgcg caccacacc	1140
caggccaggg tgttgccgg caccacctgg tcttgaccg cgtgatgaa cagggtcacg	1200
tcgtcccgga ccacaccggc gaagtgcctc tccacgaagt ccggggagaa cccgagccg	1260
tcggtccaga actcgaccgc tccggcgacg tcgcgcggc tgagcaccgg aacggcactg	1320
gtcaacttg ccatgcattg tgatgggcat tatgtgtgat gggatgcgat gggagaggga	1380
agtgtcttg atgggagtgc tggagaaaga gggagacggc gggcggcgc ccttttatac	1440
ccacgccga aagatccgat cgatactgac aaaacgggat gaacacatcg gcggcgccct	1500
ggactgcgc ccatctgcaa atgcccagcc agtcccgtc ggcgccacca ccagccctgg	1560
tcgagtcctc ctcgagggcg acgtctctatt ctatccatgc gcgcaattgc aggtgcggcg	1620
tcgaagaaca gtccttcgca gtccttctcg cacctgggct gcgacctgt ctacctctca	1680
tcctaaccctc tcgcgggctt cgcagtacag ttactaatct cacaccgaag aggtctctcg	1740
gccacctcc gatcccgagc acgttcctta catgccacag cgtcagaatt gaacacaatg	1800
cacgtcarat cagatccccg ggaattcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa	1860
ttgttatccg ctcaacaattc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg	1920
gggtgectaa tgagtgagct aactcacatt aattgogttg cgtcactgc ccgtttcca	1980
gtcggggaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcggcg ggagaggcgg	2040
tttgcatatt gggcgtctct ccgttcctc gctcactgac tgcgtgcgt ccgtctctcg	2100
ccctcggga cgggtacccg ctctctctc cgtcactgac tgcgtgcgt ccgtctctcg	2160
ccctcggga cgggtacccg ctctctctc cgtcactgac tgcgtgcgt ccgtctctcg	2220
ccctcggga cgggtacccg ctctctctc cgtcactgac tgcgtgcgt ccgtctctcg	2280

acgctcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc 2340
 tggaagctcc ctcggtcgct ctctgttcc gacctgccc ctaccggat acctgtccgc 2400
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc 2460
 ggtgtaggtc gttcgctcca agctggggtg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgaccg 2520
 ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 2580
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga 2640
 gttcttgaag tgggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 2700
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaaac 2760
 caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 2820
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtga. acgaaaactc 2880
 acgtaaggg attttggta tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa 2940
 ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta 3000
 ccaatgctta atcagtggag cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 3060
 tgcctgactc cccgtcggtg agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 3120
 tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca gatttatcag caataaacca 3180
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tctgcaact ttatccgct ccatccagtc 3240
 tattaattgt tgccgggaag ctgagtaag tagttcgcca gtaaatagtt tgcgcaacgt 3300
 tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgctc tttggtagg cttcattcag 3360
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtga aaaaagcgg 3420
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgctag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat 3480
 ggttatggca gactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt 3540
 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgcggcgac cgagttgctc 3600
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 3660
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 3720
 ttogatgtaa cccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 3780
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 3840
 gaaatgttga atactcatac tottctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 3900
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc 3960
 ggcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtctaagaa accattatta tcatgacatt 4020
 aacctataaa aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg 4080

tgaaaacctc tgacacatgc agctcccga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc 4140
 cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt ggcgggtgtc ggggctggct 4200
 taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggg gtgaaatacc 4260
 gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgccat tcgccattca ggctgcgcaa 4320
 ctgttgggaa gggcgatcgg tgcgggctc ttcgctatta cgccagctgg cgaaagggg 4380
 atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa 4440
 aacgacggcc agtgccaagc ttgcatgcct gcaggtcgac gaccgagcgc gcgccacca 4500
 gcctatcccg cgcgggtcgg gacccaaaat aagcgggcc cgcgcgcgc cgtcgggcca 4560
 gcgggtgtat ctacgaacgg aactgggagg cgactcgga gagtttgggt agaaagggga 4620
 acaccatcgc ggacggccca gtgtcttggd cagctgagcg tgcatttgt tcaattctga 4680
 cctgtggcat gtaagggaacg tgctcgggat cggagggtgg cgcgagagcc tcttcgggtg 4740
 gagattagta actgtactgc gaagccgcgg aggggttagg atgagaggta gacagggtcg 4800
 cagcccaggt gcgagaagga ctgcgaagga ctgttcttcg accgcgcacc tgcaattgcg 4860
 cgcatggata gaatagagcg tcgccctcga gggggactcg accagggtcg gtggtggcgc 4920
 ccgacgggac tggctgggca tttgcagatg gcgcgcagtc caggccgcgc ccgatgtgtt 4980
 catcccggtt tgctcagtac gatcggatct ttcgggcgtg ggtataaaag cgcgccgcc 5040
 gccgtctccc tctttctcca gactcccat ccagagcact tccctctccc atcgcatccc 5100
 atcacacaat aatgcccatc ac 5122

<210> 13

<211> 5490

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Séquence du vecteur pESC

<400> 13

agcttctccg gcccgaatc gaacggcagg atgtgtgggc gtgtccaata ttgccatgaa 60
 aatctgtcag aagtgaagcc tctcgtcacc ctgtacagct tcgctgagtt gaaaagcagg 120
 gttcatcttg ggctcactga tgcactgagc tcgaccggag aactaaatga ccagccggag 180
 tgttcactaa cttaacgcgc ggtattcagg gcagcttctc tatgttgccg ctacgacgta 240
 gctcccgcc catgaacggg ggaacgggg aggggtgctg ttggtacgta ttacgtctg 300
 gctcgtctgt ctgacagcg gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga 360
 gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga 420
 gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga 480
 gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga gctcagcga 540

gaacccgagc cggtcgggtcc agaactcgac cgctccggcg acgtcgcgcg cggtgagcac	2340
cggaaacggca ctggtcaact tggccatgca tggatgatggg cattatgtgt gatgggatgc	2400
gatgggagag ggaagtgtc tggatgggag tgctggagaa agagggagac ggccggcggc	2460
gcgccctttta taccacgcc cgaaagatcc gatcgatact gacaaaacgg gatgaacaca	2520
tccggcggcg cctggactgc gcgccatctg caaatgccca gccagtcgcc tccggcgcca	2580
ccaccagccc tggtegagtc cccctcgagg gcgacgctct attctatcca tgcgcgcaat	2640
tgcaggtgcg cggtcgaaga acagtccttc gcagtccttc tcgcacctgg gctgogaccc	2700
tgtctacctc tcatactaac cctccgcgg ctccgcagta cagttactaa tctcacaccg	2760
aagaggctct cgcgccaccc tccgatcccg agcacgttcc ttacatgccca cagcgtcaga	2820
attgaacaca atgcacgtca ratcagatcc ccgggaattc gtaatcatgg tcatagctgt	2880
ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa	2940
agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gtaactcac attaatgctg ttgcgctcac	3000
tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg	3060
cggggagagg cggtttgctg attgggcgct ctccgcttc ctcgctcact gactcgctgc	3120
gctcggctgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat	3180
ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca	3240
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc	3300
atcacaaaaa tcgacgtcga agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc	3360
aggcgtttcc ccttgaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaacctg ccgcttacccg	3420
gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta	3480
ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg	3540
ttcagcccca ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtgaagac	3600
acgacttctc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag	3660
gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat	3720
ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat	3780
ccggcaaaca aaccacogct ggtagcgggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc	3840
gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt	3900
ggaacgaaaa ctccagtttae aggttttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct	3960
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4020
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4080
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4140
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4200
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4260
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4320
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4380
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4440
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4500
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4560
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4620
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4680
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4740
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4800
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4860
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4920
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	4980
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5040
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5100
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5160
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5220
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5280
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5340
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5400
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5460
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5520
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5580
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5640
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5700
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5760
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5820
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5880
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	5940
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6000
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6060
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6120
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6180
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6240
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6300
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6360
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6420
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6480
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6540
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6600
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6660
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6720
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6780
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6840
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6900
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	6960
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7020
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7080
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7140
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7200
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7260
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7320
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7380
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7440
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7500
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7560
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7620
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7680
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7740
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7800
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7860
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7920
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	7980
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8040
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8100
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8160
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8220
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8280
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8340
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8400
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8460
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8520
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8580
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8640
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8700
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8760
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8820
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8880
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	8940
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9000
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9060
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9120
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9180
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9240
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9300
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9360
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9420
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9480
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9540
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9600
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9660
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9720
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9780
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9840
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9900
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	9960
gacatctctt aaactaaaaa tgaactttta atatatata atatatata atatatata	10020

catctggccc cagtgtgca atgataccgc gagaccacg ctcaccggt ccagatttat	4200
cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg	4260
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata	4320
gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcggtgt gtcacgctcg tcgtttggta	4380
tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt	4440
gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggctctc cgatcggtgt cagaagtaag ttggccgcag	4500
tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa	4560
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc	4620
gaccgagttg ctcttgcccg gcgtaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt	4680
taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc	4740
tgttgagatc cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta	4800
ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaaggga	4860
taaggcgac acggaatgt tgaatactca tactcttct tttcaatat tattgaagca	4920
tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac	4980
aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta	5040
ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttcgt ctgcgcggtt	5100
tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggagacggtc acagcttgtc	5160
tgtaagcgga tgccgggagc agacaagccc gtcagggcgc gtcagcgggt gttggcgggt	5220
gtcggggctg gcttaactat gcggcatcag agcagattgt actgagagt caccatatgc	5280
gggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc cattcgccat	5340
tcaggctgcg caactgttgg gaaggcgat cggtagggc ctcttcgcta ttacgccagc	5400
tggcgaaagg gggatgtgct gcaaggcgat taagttgggt aacgccaggg ttttcccagt	5460
cacgacgttg taaaacgacg gccagtgcc	5490

reçue le 16/02/04



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1./2.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 03 DH INR ORUS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400366	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE P. CINNABARINUS			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		ALVES	
Prénoms		Alexandra	
Adresse	Rue	Hemsterhuislaan 30,	
	Code postal et ville	9752	NE HAREN - Pays Bas
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		RECORD	
Prénoms		Eric	
Adresse	Rue	La Chloris, D, 13, boulevard du Redon	
	Code postal et ville	13009	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LOMASCOLO	
Prénoms		Anne	
Adresse	Rue	Le Clos de la Bastide, B, 42, traverse le Mée	
	Code postal et ville	13008	MARSEILLE
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S)		Paris, le 15 JANVIER 2004	
DU DEMANDEUR			
DU DEMANDEUR			
DU DEMANDEUR			



reçue le 16/02/04

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2./2.
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier (facultatif)		IFB 03 DH INR ORUS	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0400366	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCÉDE DE SURPRODUCTION D'UNE PROTEINE RECOMBINANTE DETERMINEE PAR DES SOUCHES MONOCARYOTIQUES DE <i>P. CINNABARINUS</i>			
LE(S) DEMANDEUR(S) : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE 147, rue de l'Université, 75338 PARIS CEDEX 07, FRANCE UNIVERSITE DE PROVENCE 3, Place Victor Hugo, F-13331 MARSEILLE CEDEX 3, FRANCE BIOMADE TECHNOLOGY FOUNDATION Nijenborgh 4, NL-9747 AG GRONINGEN, PAYS-BAS			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		SIGOILLOT	
Prénoms		Jean-Claude	
Adresse	Rue	Résidence Anémones Floralties, 500, avenue Joseph Raynaud.	
	Code postal et ville	83140	SIX FOURS LES PLAGES
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ASTHER	
Prénoms		Marcel	
Adresse	Rue	28, avenue Peymian	
	Code postal et ville	13600	LA CIOTAT
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		WÖSTEN	
Prénoms		Han A.B.	
Adresse	Rue	C. Huygenslaan 19	
	Code postal et ville	3705	SN ZEIST - Pays-Bas
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Paris, le 15 JANVIER 2004 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170 	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.